

**Untersuchung zur transkriptionellen Regulation des Angiopoietin-2  
in humanen Endothelzellen**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie  
eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Ernährungswissenschaftlerin Wenke Jonas  
geb. am 10.09.1976 in Luckenwalde

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin  
Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter/innen:

1. Prof. Dr. Alf Hamann
2. Prof. Dr. Axel R. Pries
3. PD Dr. Wolfgang Kemmner

Tag der mündlichen Prüfung: 30. 11. 2009

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>VIII</b>
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>IX</b>
<b>Summary .....</b>	<b>X</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Vaskuläre Entwicklung.....	1
1.1.1 Vaskulogenese .....	1
1.1.2 Angiogenese.....	2
1.2 Endotheliale Wachstumsfaktoren .....	4
1.2.1 Funktionen des Angiopoietin-Tie-1/Tie-2 Systems.....	5
1.2.2 Regulation der Vaskulogenese und Angiogenese durch Angiopoietin-1 und -2 sowie VEGF-A .....	9
1.3 Bedeutung von Angiogenese während pathologischer Zustände .....	10
1.3.1 Tumorassoziierte Angiogenese und Angiopoietin-2.....	11
1.4 Allgemeine transkriptionelle Mechanismen .....	13
1.5 Epigenetische Vorgänge in der Genregulation .....	14
1.5.1 DNA-Methylierung von CpGs .....	14
1.5.2 Modifikation von Histonen .....	15
1.6 Zielsetzung .....	16
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>17</b>
2.1 Gentechnische und molekularbiologische Methoden.....	17
2.1.1 Agarosegelelektrophorese.....	17
2.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	17
2.1.3 Manipulation von DNA.....	18
2.1.4 Präparation genomischer DNA.....	20
2.1.5 <i>Rapid Amplification of cDNA-Ends</i> (RACE) .....	20
2.1.6 Herstellung von 5'-Deletionskonstrukten .....	21
2.1.7 Herstellung von Promotormutanten.....	22
2.1.8 Subklonierung in ein heterologes Promotorsystem.....	23
2.1.9 Isolierung von RNA aus Zellen.....	23
2.1.10 Isolierung von RNA aus Zellen für cDNA-Microarray .....	24
2.1.11 RT-PCR (Reverse Transkription) .....	24
2.1.12 Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	24
2.1.12.1 Semiquantitative RT-PCR .....	25
2.1.12.2 <i>Real-Time</i> RT-PCR.....	26

2.1.13	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)</i> .....	28
2.1.13.1	Identifikation DNA-bindender Proteine mittels EMSA .....	28
2.1.13.2	Präparation von Kernextrakten.....	29
2.1.13.3	Hybridisierung von Oligonukleotiden.....	29
2.1.13.4	Radioaktive Oligonukleotidmarkierung.....	30
2.1.13.5	EMSA.....	31
2.1.14	DNA-Microarray.....	31
2.1.15	<i>In silico</i> Analysen des <i>ang-2</i> Gens .....	33
2.2	Immunzytologie.....	34
2.3	Allgemeine Methoden der Zellkultur.....	34
2.3.1	Kultivierung von Zellen.....	34
2.3.2	Transiente Transfektion mit Effectene® .....	35
2.3.3	<i>Dual-Luciferase Assay</i> .....	37
2.3.4	Stimulation von Zellen mit 5-Aza-dC und TSA.....	38
2.3.5	Proliferations-Analyse.....	38
2.3.6	Lichtmikroskopische Aufnahmen vitaler Zellen .....	38
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>39</b>
3.1	Untersuchung der <i>ang-2</i> Expression in Endothel- und Epithelzellen nach Inkubation mit 5-Aza-2'-desoxycytidin (5-Aza-dC) und Trichostatin A (TSA) .....	39
3.1.1	Expression von Komponenten des Ang-Tie-Systems in Endothel- und Epithelzellen .....	39
3.1.2	Einfluss von 5-Aza-dC und TSA auf Morphologie und Proliferation.....	41
3.1.2.1	Wirkung von 5-Aza-dC .....	41
3.1.2.2	Wirkung von TSA.....	42
3.1.3	Einfluss von 5-Aza-dC auf die <i>ang-2</i> Expression .....	44
3.1.4	Einfluss von TSA auf die <i>ang-2</i> Expression .....	45
3.1.5	Auswirkung der kombinierten Behandlung mit 5-Aza-dC und TSA auf die <i>ang-2</i> Expression .....	46
3.1.6	Identifizierung CpG-reicher Regionen im <i>ang-2</i> Gen .....	48
3.2	Untersuchung der globalen Demethylierung in Endothelzellen durch 5-Aza-dC mittels explorativer <i>Microarray</i> -Untersuchung .....	49
3.2.1	Auswertung des <i>Microarrays</i> mit EA.hy926 Zellen.....	49
3.2.2	Auswertung des <i>Mircoarrays</i> mit HUVEC Zellen.....	51
3.2.3	Vergleich zwischen EA.hy926 und HUVEC .....	52
3.3	Funktionelle Analyse des <i>ang-2</i> Promotors in humanen Endothelzellen .....	55
3.3.1	Klonierung des humanen <i>ang-2</i> Gens in pGL3 Vektor .....	55
3.3.2	Bestimmung der Lokalisation von Ang-2 und der relativen Menge der <i>ang-2</i> Expression in verschiedenen Endothelzelllinien .....	58
3.3.3	Promotoraktivität von <i>ang-2</i> in Endothelzelllinien.....	60
3.3.4	Identifizierung regulatorischer <i>ang-2</i> Promotorbereiche .....	60
3.3.5	Regulation des <i>ang-2</i> Promotors durch Sp-Transkriptionsfaktoren .....	63

3.3.6	Funktionelle Analyse der Regulation von <i>ang-2</i> durch Sp-Transkriptionsfaktoren im <i>in vitro</i> Modell .....	68
3.3.7	Sp1/Sp3-vermittelte <i>ang-2</i> Minimalpromotor Aktivierung wurde nicht durch 5-Aza-dC beeinflusst.....	71
3.3.8	Mutation potentieller Bindungsmotive für Transkriptionsfaktoren der ETS-Familie .....	73
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>75</b>
4.1	Epigenetische Regulation .....	75
4.1.1	Induktion der <i>ang-2</i> Expression in Endothelzellen durch globale Demethylierung induziert .....	76
4.1.2	Untersuchung der Expression angiogeneserelevanter Gene in Endothelzellen nach globaler Demethylierung im explorativen <i>Microarray</i> .....	77
4.2	Bestimmung des Transkriptionsstarts .....	80
4.3	Promotorelemente des <i>ang-2</i> Gens .....	81
4.3.1	Die TATA-Box.....	81
4.3.2	Die Initiatorregion ( <i>Inr</i> ).....	82
4.4	5'-Deletionsanalyse – Bestimmung des Minimalpromotorbereichs .....	83
4.5	Identifikation von Transkriptionsfaktoren.....	83
4.5.1	Sp1/Sp3 .....	85
4.5.2	ETS-Transkriptionsfaktoren.....	87
4.6	Angiopoietin-2 – Angriffspunkt für die antiangiogene Tumorthapien .....	88
4.6.1	Sp- und ETS-Transkriptionsfaktoren als potentielle Ziele in der Ang-2 spezifischen antiangiogenen Therapie .....	90
	<b>Literatur .....</b>	<b>92</b>
	<b>Anhang .....</b>	<b>104</b>
	Zusätzliche Daten zur <i>Microarray</i> -Untersuchung .....	104
	<b>Danksagung .....</b>	<b>106</b>
	<b>Erklärung .....</b>	<b>107</b>
	<b>Veröffentlichungen .....</b>	<b>108</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>5-Aza-dC</b>	5-Aza-2'-desoxycytidin	<b>G</b>	Guanosin
<b>A</b>	Adenosin	<b>GFT</b>	<i>General transcription factor</i>
<b>Abb.</b>	Abbildung	<b>Grb</b>	<i>Growth factor receptor-bound protein</i>
<b>AD</b>	Aktivierungsdomäne	<b>GSP</b>	Genspezifischer Primer
<b>Akt</b>	Proteinase B	<b>HDAC</b>	Histondeacetylase
<b>Ang</b>	Angiopoietin	<b>Ig</b>	Immunglobulin
<b>AP</b>	<i>Activator protein</i>	<b>IGF</b>	<i>Insulin-like growth factor</i>
<b>APS</b>	Amoniumpersulfat	<b>Inr</b>	Initiator-(Element)
<b>bFGF</b>	<i>Basic fibroblast growth factor</i>	<b>kb</b>	Kilobase
<b>bp</b>	Basenpaar	<b>kD</b>	Kilo Dalton
<b>BSA</b>	<i>Bovine serum albumine</i>	<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>C</b>	Cytidin	<b>Luc</b>	Luziferase
<b>cDNA</b>	Komplementäre DNA	<b>MMP</b>	Matrix-Metalloproteinase
<b>CDS</b>	<i>Coding DNA-sequence</i>	<b>Nck</b>	<i>Non catalytic region of tyrosine kinase</i>
<b>CpG</b>	Cytidin-Phosphat-Guanosin	<b>NP-40</b>	NonidetP-40
<b>cpm</b>	Zerfälle pro Minute	<b>NTC</b>	<i>Non template control</i>
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride	<b>OD</b>	Optische Dichte
<b>DBD</b>	DNA-Bindungsdomäne	<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i>
<b>ddH2O</b>	Zweifach destilliertes Wasser	<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion
<b>DEPC</b>	<i>Diethyl pyrocarbonate</i>	<b>PI(3)K</b>	Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	<b>PKC</b>	Proteinkinase C
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid	<b>PMA</b>	Phorbol 12-myristate 13-acetate
<b>DNA</b>	Desoxyribonucleinsäure	<b>PMSF</b>	Phenylmethylsulfonylfluorid
<b>DNMT</b>	DNA-Methyltransferase	<b>RACE</b>	<i>Rapid Amplification of cDNA-Ends</i>
<b>dNTP</b>	Desoxyribonukleotide	<b>RasGAP</b>	Ras GTPase aktivierendes Protein
<b>DTT</b>	Dithiothreitol	<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>E.coli</b>	<i>Escherichia coli</i>	<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>EBS</b>	<i>Ets-binding site</i>	<b>RT</b>	Reverse Transkriptase
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat	<b>RTK</b>	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
<b>EGF</b>	<i>epidermal growth factor</i>	<b>S.E.M.</b>	<i>Standard error of mean</i>
<b>Egr</b>	<i>Early growth response protein</i>	<b>SAP</b>	<i>Shrimp alkaline phosphatase</i>
<b>EMSA</b>	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>	<b>SDM</b>	<i>Site-Directed Mutagenesis</i>
<b>EZM</b>	Extrazelluläre Matrix	<b>SDS</b>	Sodiumdodecylsulfate
<b>FAK</b>	<i>Focal adhesion kinase</i>		
<b>FRET</b>	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer		

<b>SHp2</b>	<i>SH2-containing phosphatase 2</i>	<b>TIMP</b>	<i>Tissue inhibitor of MMP</i>
<b>Sp</b>	<i>Specificity protein</i>	<b>Tk</b>	Thymidinkinase
<b>T</b>	Thymin	<b>Tris</b>	<i>Tris(hydroxymethyl-) aminomethan</i>
<b>Tab.</b>	Tabelle	<b>TS</b>	Transkriptionsstartpunkt
<b>TBE</b>	Tris-Borat-EDTA	<b>TSA</b>	Trichostatin A
<b>TBP</b>	<i>TATA-binding protein</i>	<b>UTR</b>	Untranslatierte Region
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin	<b>UV</b>	Ultra Violett
<b>TF</b>	Transkriptionsfaktor	<b>V</b>	Volt
<b>Tie</b>	<i>Tyrosine kinase with immunglobuline- and epidermal growth factor homology domains</i>	<b>VEGF(R)</b>	<i>Vascular endothelial growth factor (receptor)</i>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Angiogenese durch Kapillarsprossung. ....	3
Abb. 2: Schematische Darstellung von endothelialen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und ihren Liganden..	5
Abb. 3: Tie-2 Signaltransduktion. ....	7
Abb. 4: Aufbau der Angiopoietine.....	8
Abb. 5: Regulation der Vaskulogenese und Angiogenese durch Angiopoietin (Ang)-1/2 und das VEGF ( <i>vascular endothelial growth factor</i> )-System. ....	10
Abb. 6: Modelle zur Tumorangiogenese. ....	12
Abb. 7: Schematische Darstellung der 5'-RACE.....	20
Abb. 8: Prinzip der <i>TaqMan</i> <sup>TM</sup> -PCR. ....	26
Abb. 9: Fließschema des <i>Microarrays</i> (Agilent Technologies).....	32
Abb. 10: Durch Leuchtkäfer- und <i>Renilla</i> -Luziferase katalysierte Biolumineszenz-Reaktion. ....	37
Abb. 11: Expressionsprofil von Komponenten des Ang-Tie-Systems in verschiedenen Endothel- und Epithelzelllinien. ....	40
Abb. 12: Einfluss von Demethylierung mittels 5-Aza-dC auf die Expression von Komponenten des Ang-Tie-Systems in verschiedenen Zelllinien.....	41
Abb. 13: Die demethylierende Substanz 5-Aza-dC hat keinen negativen Einfluss auf Morphologie und Proliferation von EA.hy926 Zellen. ....	42
Abb. 14: Toxische Wirkung von TSA auf EA.hy926 Zellen.....	43
Abb. 15: Gesteigerte <i>ang-2</i> Expression durch Änderung des globalen Methylierungsstatus in Endothel- und Epithelzellen mit Hilfe der demethylierenden Substanz 5-Aza-dC. ....	45
Abb. 16: Die Wirkung des Histon-Deacetylase-Inhibitors TSA hat keinen Einfluss auf die <i>ang-2</i> Expression in Endothelzellen. In Epithelzellen wurde <i>ang-2</i> induziert.....	46
Abb. 17: Kein additiver Effekt von 5-Aza-dC und TSA auf die <i>ang-2</i> Expression.....	47
Abb. 18: CpG-Plot der <i>ang-2</i> Sequenz.....	48
Abb. 19: Vergleich der Daten zur Änderung der <i>ang-2</i> Expression aus <i>Microarray</i> (A) und quantitativer <i>Real-Time</i> RT-PCR (B) in EA.hy926 Zellen. ....	50
Abb. 20: Vergleich der Daten zur Änderung der <i>ang-2</i> Expression aus <i>Microarray</i> (A) und quantitativer <i>Real-Time</i> RT-PCR (B) in HUVEC Zellen. ....	52
Abb. 21: Transkriptionelle Validierung ausgewählter induzierter Gene (FC>2) mittels <i>Real-Time</i> RT- PCR. ....	53
Abb. 22: Klonierung des humanen <i>ang-2</i> Gens. ....	55
Abb. 23: Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts in MKN-45 und HMEC-I Zellen mittels 5'-RACE. .....	56
Abb. 24: Sequenz der 5'-flankierenden Region des humanen <i>ang-2</i> Gens. ....	57
Abb. 25: Expression und Promotoraktivität von <i>ang-2</i> in Endothelzelllinien. ....	59
Abb. 26: Bestimmung des essentiellen <i>ang-2</i> Promotorbereichs. ....	61
Abb. 27: Untersuchung von Teilbereichen des Minimalpromotors <i>ang-2</i> (-105/+51). ....	63
Abb. 28: Untersuchung potentieller Transkriptionsfaktoren auf ihre Bindung an die Sonde A [ <i>ang-2</i> (- 105/+51)] mittels Kompetitionsstudien.....	64

---

Abb. 29: Bindung der Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 an den regulatorischen Minimalpromotorbereich. ....	65
Abb. 30: Verlust der Promotoraktivität durch Mutation der GC-Boxen im Minimalpromotor.....	67
Abb. 31: Die Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 führen zu einer konzentrationsabhängigen Transaktivierung von <i>ang-2</i> (-105/+51) in <i>Drosophila melanogaster</i> SL-2 Zellen.....	68
Abb. 32: Interaktion der Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 mit dem Minimalpromotor <i>ang-2</i> (-105/+51) in <i>Drosophila melanogaster</i> SL-2 Zellen. ....	69
Abb. 33: Die Mutation der GC-Box I im Minimalpromotorbereich führte zu einer veränderten Interaktion der Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 in <i>Drosophila melanogaster</i> SL-2 Zellen. ....	71
Abb. 34: Weder die DNA-Protein-Komplexbildung von Sp1 und Sp3 noch deren Transaktivierung wurden durch 5-Aza-dC beeinflusst. ....	72
Abb. 35: Mutation von EBS-1 bis 3 führte zu einer signifikanten Reduktion der <i>ang-2</i> Promotoraktivität in Endothelzellen. ....	74
Abb. 36: Vergleich der publizierten Daten zum <i>ang-2</i> Transkriptionsstartpunkt mit den eigenen Arbeiten.....	81



## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Bakterienstämme .....	19
Tab. 2: Primersequenzen für Deletionsanalyse .....	22
Tab. 3: Primersequenzen für SDM .....	22
Tab. 4: Sequenzen zur Klonierung in den Reportergenvektor pT81.....	23
Tab. 5: Primersequenzen für semiquantitative RT-PCR .....	25
Tab. 6: Primersequenzen für <i>Real-Time</i> RT-PCR.....	27
Tab. 7: Sondensequenzen für <i>Real-Time</i> RT-PCR.....	28
Tab. 8: Zusammensetzung der Puffer zur Präparation von Kernextrakten.....	29
Tab. 9: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide im EMSA .....	30
Tab. 10: Antikörper für <i>Supershift</i> -Studien .....	31
Tab. 11: Zelllinien .....	35
Tab. 12: Transfektionsprotokolle .....	36
Tab. 13: Liste der verwendeten Plasmide .....	36
Tab. 14: Allgemeine Gegenüberstellung der Anzahl der regulierten <i>Probe Sets</i> nach globaler Demethylierung mittels 5-Aza-dC in EA.hy926 Zellen. ....	49
Tab. 15: Anzahl der <i>Probe Sets</i> , die durch 5-Aza-dC konzentrationsabhängig in EA.hy926 Zellen reguliert wurden. ....	50
Tab. 16: Allgemeine Gegenüberstellung der Anzahl der regulierten <i>Probe Sets</i> nach globaler Demethylierung mittels 5-Aza-dC in HUVEC Zellen. ....	51
Tab. 17: Anzahl der <i>Probe Sets</i> , die durch 5-Aza-dC konzentrationsabhängig in HUVEC Zellen reguliert wurden. ....	51
Tab. 18: Anzahl der Gene, deren Expression durch 1 $\mu$ M 5-Aza-dC sowohl in EA.hy926 als auch in HUVEC Zellen differentiell reguliert wurde. ....	52
Tab. 19: Aufstellung von Genen aus der ANGIOGENESE-LISTE, die sowohl in EA.hy926 als auch HUVEC Zellen induziert wurden (FC>2). ....	104
Tab. 20: Aufstellung von Genen aus der ANGIOGENESE-LISTE, die sowohl in EA.hy926 als auch in HUVEC Zellen runterreguliert wurden (FC<0,5).....	105

## Zusammenfassung

Die Angiopoietine (Ang-1 und Ang-2) sind Liganden der endothelialen Rezeptor-Tyrosin-Kinase Tie-2 und haben eine zentrale Stellung in der Regulation von Angiogenese. Während *ang-1* von vielen humanen Geweben exprimiert wird und als Tie-2-Rezeptor Agonist die Blutgefäßreifung und -stabilisierung fördert, wird die Expression des Tie-2 Antagonisten *ang-2* streng gewebsspezifisch reguliert. Ang-2 wirkt gefäßdestabilisierend und ist notwendig für das Aussprossen von Gefäßen am Anfang der angiogenen Kaskade. Zahlreiche Studien lassen einen Zusammenhang zwischen Ang-2 und einer pathologischen Angiogenese vermuten wie bei der Neoangiogenese in soliden Tumoren oder der Diabetischen Retinopathie. Die molekularen Mechanismen der *ang-2* Regulation sind jedoch noch weitgehend unverstanden.

Aufgrund der zentralen Bedeutung der DNA-Methylierung bei der Tumorgenese und der Effizienz von Inhibitoren der DNA-Methyltransferasen (DNMT) wie 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-dC) könnten Therapien mit DNMT-Inhibitoren ein effektives Behandlungsverfahren bei Krebserkrankungen darstellen. Der Einfluss der demethylierenden Wirkung von 5-Aza-dC auf die Genexpression ist dabei klar belegt. Die Auswirkungen der Demethylierung auf nicht-transformierte Zellen als potentielle Ziele einer solchen systemischen Therapie sind bisher nur unzureichend untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurden mittels *Microarray*-Analyse die genomweiten Expressionsänderungen in endothelialen Zellen nach Behandlung mit 5-Aza-dC untersucht. Mit dem Fokus auf angiogeneserelevante Gene wurde *ang-2* unter den induzierten Genen identifiziert. Obwohl die Endothelzellen bereits unter Kontrollbedingungen *ang-2* exprimierten, konnte die Expression durch Demethylierung weiter gesteigert werden. Die Expressionsänderungen wurden zudem mittels *Real-Time* RT-PCR validiert. Durch einen CpG-Plot konnten jedoch keine potentiellen CpG-Inseln in unmittelbarer Nähe des Transkriptionsstarts identifiziert werden. Diese Daten lassen auf einen methylierungsunabhängigen Effekt von 5-Aza-dC auf die *ang-2* Expression schließen.

Im zweiten Teil der Arbeit lag der Schwerpunkt auf der molekularen Analyse der *ang-2* Genexpression in Endothelzellen. Auf die Klonierung von 3 kb der 5'-flankierenden Sequenz des humanen *ang-2* Gens und der Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts (TS), folgte die Identifikation regulatorischer Promotorelemente durch funktionelle 5'-Deletionsanalyse und zielgerichtete Mutagenese. Die Promotorregion -105 bis +51 relativ zum TS wurde als ausreichend und notwendig für die Vermittlung der basalen *ang-2* Expression erkannt. Mit Hilfe von *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSA) wurden die Zinkfinger-Proteine Sp1 (*specificity protein 1*) und Sp3 als Transkriptionsfaktoren identifiziert, die primär an den *ang-2* Promotorbereich binden. Darüber hinaus erwiesen sich die Basen -78 bis -74 relativ zum TS als essentielle Sp1-Bindestelle für die Regulation der *ang-2* Expression. Die ektopische Expression von Sp1 und Sp3 in Sp-Faktor defizienten *Drosophila melanogaster* SL-2 Zellen führte zur potenten Transaktivierung des *ang-2* Promotors. Die Mutation von potentiellen Bindungsstellen für Proteine der ETS-Familie führte zu einer signifikanten Reduktion der *ang-2* Promotoraktivität. Die Spezifität von ETS-Proteinen konnte in Bindungsstudien jedoch nicht bestätigt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit haben neue Einblicke in die *ang-2* Regulation offenbart und zeigen, dass die Sp1/Sp3-abhängige Aktivierung des proximalen Promotorbereichs (-105/-56) entscheidend für die transkriptionelle *ang-2* Regulation in Endothelzellen ist.

Schlagwörter: Angiopoietin-2, Promotor, Methylierung, Endothelzellen

## Summary

Angiopoietins (Ang-1 and Ang-2) are ligands of the endothelial cell tyrosine kinase receptor Tie-2 and play a critical role in the regulation of angiogenesis. *Ang-1* is widely expressed in normal adult tissues and promotes blood vessel maturation and stabilization by inducing Tie-2 receptor phosphorylation, whereas the expression of the antagonistic ligand *ang-2* is tightly regulated. Ang-2 acts destabilizing on blood vessels and is mandatory for the onset of the angiogenic cascade. Despite the accumulating evidence confirming the involvement of Ang-2 in pathologic angiogenesis including neoangiogenesis in solid tumors or Diabetic retinopathy, the molecular mechanisms controlling *ang-2* expression are still unclear.

The importance of DNA methylation during tumorigenesis and the efficiency of DNMT-inhibitors (DNA-methyltransferase) like 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) in reversing DNA methylation changes has led to the suggestion that drug-induced demethylation may be an effective therapeutic intervention in cancer. The relationship between DNA demethylation by 5-aza-dC and gene expression has been well studied. However the effect of demethylation on non-transformed cells which are potential targets during the systemic application of the inhibitor has not been widely examined so far. Using microarray analysis, the global changes of gene expression were investigated after 5-aza-dC treatment in endothelial cells. Focusing on angiogenesis related genes *ang-2* was identified among the upregulated ones. Although the endothelial cell populations expressed *ang-2* under control conditions already the expression was further increased by drug-induced demethylation. The results were validated by means of *Real-time* RT-PCR. A screen for CpG-islands revealed no putative islands surrounding the transcription initiation site. These data indicate a methylation-independent effect of 5-aza-dC on the *ang-2* expression.

The second part of this thesis was focused on the characterization of *ang-2* gene expression in endothelial cell lines and on the elucidation of underlying molecular mechanisms. Following genomic cloning of 3 kb of the human *ang-2* gene and determination of the transcription start site (TS), regulatory promoter elements were identified by functional 5'-deletion analysis and site-directed mutagenesis. The promoter region -105 to +51 relative to TS was recognized as sufficient and necessary for the *ang-2* gene transcription. Electrophoretic mobility shift assays (EMSA) revealed the zinc finger proteins Sp1 (specificity protein 1) and Sp3 as dominant nuclear proteins binding to the *ang-2* promoter. Moreover, the region spanning -78/-74 was identified as essential Sp1/3 site regulating *ang-2* expression. Ectopic expression of Sp1 and Sp3 in Sp-factor deficient *Drosophila melanogaster* SL-2 cells revealed potent transactivation of the *ang-2* promoter. The mutation of potential ETS-binding sites resulted in a significant decrease of *ang-2* promoter activity. However, the binding of ETS-proteins could not be confirmed by means of EMSA. The results of this thesis revealed new insights of *ang-2* regulation and strongly suggest that Sp1/Sp3-dependent activation of an upstream enhancer at -105 to -56 is crucial for the regulation of *ang-2* expression in endothelial cells.

Key words: Angiopoietin-2, promoter, methylation, endothelial cells

## 1 Einleitung

Das Wissen über die molekularen Grundlagen der Gefäßentwicklung hat in den letzten Jahren durch Untersuchungen zur Bedeutung der Gefäßneubildung bei Entstehung, Wachstum und Metastasierung von soliden Tumoren zugenommen. Die Ausbildung neuer Blutgefäße spielt bei der Entstehung und Progression verschiedener weiterer Krankheiten, wie Diabetische Retinopathie, Arthritis, Psoriasis und Herzinfarkt ebenfalls eine entscheidende Rolle. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen wurden weitgehend entschlüsselt, zur vollständigen Aufklärung sind jedoch weitere Untersuchungen erforderlich.

Die molekulare Kontrolle der Angiogenese unterliegt im Wesentlichen dem Einfluss endothelialer Wachstumsfaktoren und deren Membranrezeptoren, wobei das zelluläre Zielkompartiment dieser Angiogenesefaktoren vaskuläre und/oder lymphatische Endothelzellen sind. In differenzierten Geweben mammalischer Organismen werden Angiogeneseprozesse durch eine ausgewogene Balance von anti- und proangiogenen Faktoren reguliert. Angiogenese findet hier nur in sehr beschränktem Maße statt. Dieses Gleichgewicht verschiebt sich während der Embryonal- und frühen Postnatalentwicklung, im Verlauf der Menstruation, bei Muskeltraining sowie bei der Wund- und Ulkusheilung. Im Gegensatz zur nahezu unterdrückten Angiogenese kommt es jetzt aufgrund der gestiegenen Sauerstoff- und Nährstoffanforderungen der Gewebe und/oder veränderter Perfusionsbedingungen der Blutgefäße zur verstärkten Expression proangiogener Faktoren und zur Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten der Angiogenese. Innerhalb eines Gewebes bestimmt also das Expressionsprofil angiogeneseregulierender Faktoren ob und in welchem Umfang es zur Angiogenese kommt. Die Expression endothelialer Wachstumsfaktoren und -rezeptoren wird größtenteils durch transkriptionelle Mechanismen reguliert, wobei lokale Sauerstoffspannung und pH-Wert, reaktive Sauerstoffmetabolite (oxidativer Stress) sowie Zytokine und andere nicht-endotheliale Wachstumsfaktoren wesentliche Einflussgrößen der Expression von Angiogenesefaktoren und -rezeptoren darstellen.

### 1.1 Vaskuläre Entwicklung

Fast alle Gewebe entwickeln ein vaskuläres Netzwerk, das Zellen mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt und gleichzeitig den Abtransport von metabolischen Endprodukten ermöglicht. Die Blutgefäßbildung ist ein Prozess, der vorrangig während der Embryogenese abläuft und nur in einem geringen Maße während des postnatalen Lebens stattfindet. Einmal etabliert, stellt das vaskuläre Netzwerk ein stabiles System dar, welches einer sehr langsamen Regenerationsrate unterliegt. Zwei Prozesse sind für die Bildung neuer Blutgefäße verantwortlich: die Vaskulogenese und die Angiogenese.

#### 1.1.1 Vaskulogenese

Während der frühesten Stadien der Embryonalentwicklung erhält der Embryo Nährstoffe und Sauerstoff durch Diffusion. Doch bereits in der 3. Woche ist die Versorgung des Embryos über Diffusion erschwert, da Diffusionsstrecken und -zeiten zu groß geworden sind. Die Bildung von

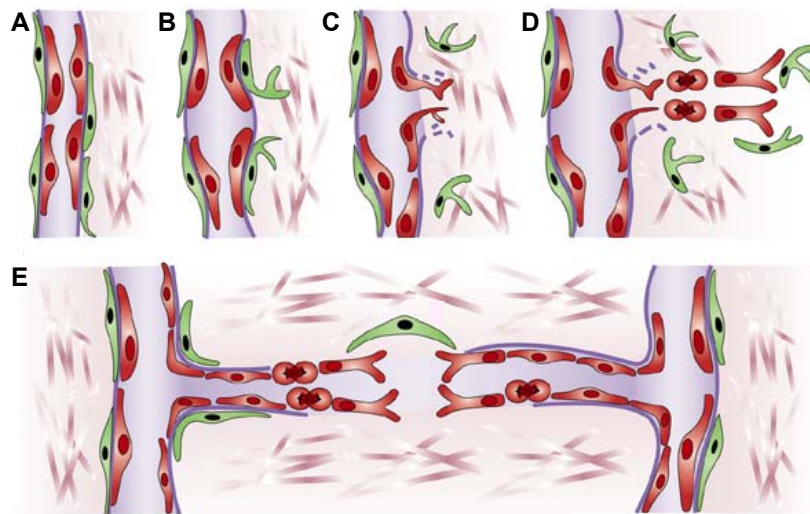
Blutgefäßen und roten Blutkörperchen setzt in den „Blutinseln“ ein und der Embryo entwickelt sich zu einem vaskularisierten Organismus, dessen Überleben von einem funktionellen Blutgefäßnetzwerk abhängt. Die ersten Schritte der *de novo* Gefäßbildung werden als Vaskulogenese bezeichnet [1,2]. Durch *in situ* Differenzierung von undifferenzierten mesodermalen Vorläuferzellen, Angioblasten bzw. Hämangioblasten, den gemeinsamen Vorläufern von Endothelzellen und Zellen der hämatopoetischen Reihe, entsteht ein primitives vaskuläres Labyrinth [3]. Dieses primäre Netzwerk stellt die Grundlage für das reife Gefäßsystem, welches durch Weiterentwicklung bzw. auch Rückbildung von bestimmten Gefäßen gebildet wird.

Lange ging man davon aus, dass Vaskulogenese nur während der embryonalen Entwicklung stattfindet. Neue Befunde belegen, dass nicht nur in embryonalen sondern auch in ausdifferenzierten Geweben unter ischämischen, malignen oder inflammatorischen Bedingungen endotheliale Vorläuferzellen aus dem Knochenmark zum Gefäßwachstum beitragen. Dieser Vorgang wird therapeutisch genutzt, um die Bildung von Blutgefäßen in ischämischen Geweben zu stimulieren [4,5]. Am Beispiel der Ausbildung solider Tumoren wird deutlich, dass die Blutgefäßbildung auf einem Zusammenspiel von Angiogenese und Vaskulogenese beruht. Dies weist darauf hin, dass auch postnatale Neoangiogenese nicht nur auf dem Aussprossen bestehender Gefäße basiert.

### 1.1.2 Angiogenese

Die Weiterentwicklung sowie Reifung des primären Gefäßplexus wird durch den Vorgang der Angiogenese beschrieben, der sowohl im Embryo als auch im differenzierten Organismus abläuft. Die Bildung von Gefäßen aus bereits existierenden erfolgt durch mindestens zwei unterschiedliche Vorgänge: durch Aussprossen (*sprouting*) oder durch intussuszeptives Wachstum (*splitting*), der Gefäßteilung [6,7]. Auf der einen Seite ist das Aussprossen ein relativ langsamer Vorgang, der auf Zellproliferation beruht. Aufgrund des invasiven Charakters können avaskuläre Gebiete erreicht werden. Auf der anderen Seite findet intussuszeptives Wachstum, das im Wesentlichen unabhängig von Zellproliferation ist, innerhalb von wenigen Stunden oder sogar Minuten statt. Durch Einstülpungen der extrazellulären Matrix wird das Gefäßlumen geteilt. Auf diese Weise werden bestehende Gefäße gespalten [8].

Angiogenese ist unter physiologischen Bedingungen und bei konstanten Leistungsanforderungen im Adulten ein sehr seltenes Ereignis. In ausdifferenzierten Geweben wird die Durchblutung dem nur in Grenzen schwankenden Bedarf an Sauerstoff und Nährstoffen durch die Regulation des Blutgefäßtonus angepasst. Angiogenese ist hierfür normalerweise nicht notwendig. Die vorhandenen Gefäße bleiben erhalten und mitotische Teilung von Endothelzellen dient lediglich ihrer Erneuerung, wobei die Zellen des Endothels zu den langlebigsten Zellen außerhalb des zentralen Nervensystems gehören. Nur 0,01% der Endothelzellen befinden sich zu einem gegebenen Zeitpunkt in der Phase der Zellteilung [9]. Zwischen pro- und antiangiogenen Faktoren besteht in differenzierten Geweben ein Gleichgewicht, welches zu einem ausgewogenen Verhältnis von Apoptose und Proliferation von Endothelzellen führt (*angiogenic balance*) [10]. Durch Veränderung des Gleichgewichts zugunsten proangiogener Faktoren, z.B. durch Entzündungsreaktionen oder während der Wundheilung setzt Kapillarsprossung ein, wobei es sich um einen mehrstufigen Prozess handelt (Abb. 1).



**Abb. 1: Angiogenese durch Kapillarsprossung.**

A) Neue Gefäße entstehen aus bereits existierenden Kapillaren. B) Der Prozess wird durch die Ablösung von Perizyten (grün) und durch Vasodilatation eingeleitet. Daran schließt sich der Abbau der Basalmembran und der Extrazellulären Matrix an. C) Endothelzellen (rot) können daraufhin dem angiogenen Stimulus entgegen in den perivaskulären Raum migrieren. D) Die Endothelzellen proliferieren und folgen einander dirigiert von Perizyten in den perivaskulären Raum. E) Die migrierten Endothelzellen gehen hinter der Proliferationszone wieder feste Verbindungen untereinander ein und schaffen ein Lumen. Dieser Vorgang wird von der Bildung der Basalmembran und der Assoziation von Perizyten mit dem Gefäß begleitet. Schließlich anastomosieren Blutgefäßausläufer und bilden einen Kreislauf. (modifiziert nach [10])

Eingeleitet wird das Aussprossen von Endothelzellen aus Kapillaren und postkapillären Venolen durch Vasodilatation und den Anstieg der Permeabilität. Vor allem Stickstoffmonoxid (NO) ist maßgeblich beteiligt, nicht nur durch Wirkung auf die glatte Muskulatur, was zur Dilatation der Gefäße führt, sondern auch an der Induktion von VEGF (*vascular endothelial growth factor*), welches die Gefäßpermeabilität erhöht [11]. Bevor Endothelzellen den Zellverband verlassen und migrieren können, ist der enzymatische Abbau der Basalmembran durch Proteasen sowie das Ablösen der gefäßummantelnden peridendothelialen Zellen (Perizyten für Kapillaren und glatte Muskelzellen für größere Gefäße) erforderlich (Abb. 1B). Durch den enzymatischen Abbau wird der notwendige Freiraum für die Zellmigration geschaffen und es werden durch die Proteasen in Matrixproteinen verankerte Wachstumsfaktoren freigesetzt (z.B. VEGF, bFGF, IGF-1). Vorrangig beteiligt sind MMPs (Matrix-Metalloproteinasen) [12] und Plasmin, das sich durch eine breite Substratspezifität auszeichnet. Es spaltet sowohl verschiedene Komponenten der Basalmembran als auch der Extrazellulären Matrix (EZM). Reguliert wird dieser Vorgang durch die gemeinsame Freisetzung von gewebsständigen Inhibitoren der MMPs (TIMP, *tissue inhibitors of MMP*) welche die Enzymaktivität der Proteinase regulieren und eine übermäßige proteolytische Aktivität verhindern [12,13].

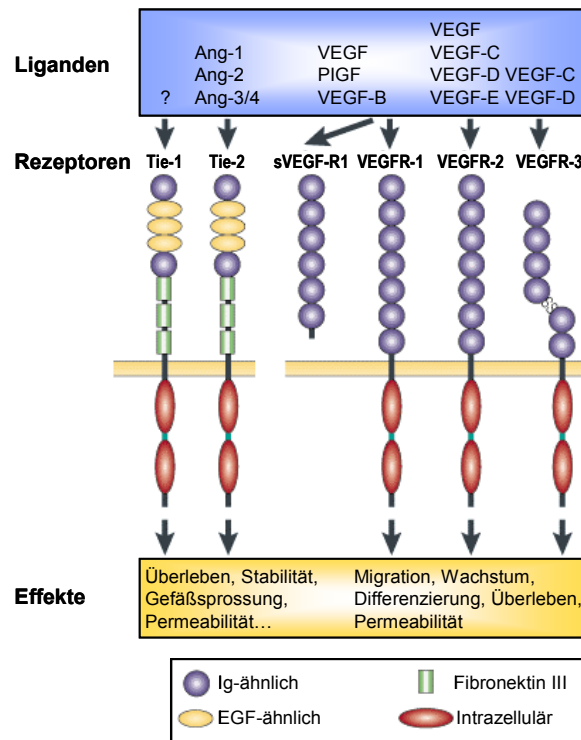
Durch die freigesetzten Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, die einen angiogenen Stimulus auf das Endothel ausüben, können die aktivierten Endothelzellen den Zellverband verlassen, dem angiogenen Signal entgegen in die aufgelöste EZM migrieren (Abb. 1C) und dort proliferieren (Abb. 1D). Bisher sind vor allem die angiogenen Wirkungen von VEGF-A und bFGF gut untersucht worden. Daneben existiert noch eine Vielzahl weiterer Wachstumsfaktoren, deren Funktion bisher nur

unzureichend aufgeklärt ist. Das Aussprossen von Endothelzellen wird von verschiedenen Molekülen induziert: So kann Angiopoietin-1 (Ang-1), das konstitutiv von perivaskulären Zellen gebildet wird, über die Aktivierung des Rezeptors Tie-2 das Aussprossen von Endothelzellen bewirken [14,15]. Ebenso führt eine Blockierung des Tie-2-Signalwegs in Gegenwart von VEGF-A durch Ang-2, das nur von aktivierten Endothelzellen sezerniert wird, zum Aussprossen. Die migrierten Zellen bilden solide Stränge aus, die ein Lumen formen (Abb. 1E). Über die Fusion mit existierenden Gefäßen kann sowohl die Länge als auch der Durchmesser der Gefäße und der Grad der Vernetzung zunehmen. Zur Ausbildung eines reifen Gefäßnetzwerks müssen die neu formierten Gefäße durch Rekrutierung von mesenchymalen Vorläuferzellen stabilisiert werden. Durch die Ummantelung der unreifen Blutgefäße mit Perizyten im Kapillarnetz bzw. glatten Muskelzellen werden die Proliferation, Migration, Differenzierung der Endothelzellen und das weitere Aussprossen der Gefäße sowie Blutvolumenstrom und Gefäßpermeabilität reguliert [16]. Der Verlust oder die unzureichende Ausstattung von Gefäßen mit periendothelialen Zellen kann zu erhöhter Gefäßpermeabilität und -vergrößerung sowie zu Blutungen führen [17]. In den neu gebildeten reifen Gefäßen sind die Endothelzellen resistent gegenüber exogenen Faktoren. Eine Homöostase stellt sich ein und die Zellen können einen langen Zeitraum überleben. Ein wichtiger Vermittler für die Aufrechterhaltung der Gefäßintegrität ist VEGF-A [18]. Ebenso wirkt Ang-1 über den Rezeptor Tie-2 positiv auf das Überleben von Endothelzellen [19]. Dem gegenüber steht Ang-2, welches in Abwesenheit von angiogenen Stimulatoren einen negativen Einfluss auf das Zellüberleben ausübt [20]. Physiologisch tritt eine verkürzte Überlebensdauer von Endothelzellen im Ovar auf, welche mit einer Gefäßregression verbunden ist.

## **1.2 Endotheliale Wachstumsfaktoren**

Bisher wurden zwei Rezeptor-Tyrosin-Kinase-(RTK)-Familien identifiziert, die sich durch ihre endothelzellspezifische Expression auszeichnen (Abb. 2). Die erste Gruppe besteht aus den drei Rezeptoren der vaskulär endothelialen Wachstumsfaktoren (VEGF). VEGF-A ist der vermutlich am besten untersuchte endotheliale Wachstumsfaktor. Durch seine Bindung an die Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 und deren Aktivierung wird sowohl die embryonale Vaskulogenese als auch die Angiogenese gefördert. In pathologischen vaskulären Zusammenhängen wie der Tumorangiogenese nimmt VEGF-A ebenfalls eine zentrale Stellung ein [21].

Eine zweite RTK-Familie wird durch die Rezeptoren Tie-1 und Tie-2 (TEK) gestellt, die ebenfalls über ihre Liganden, die Angiopoietine, modulierend an der Ausbildung und Aufrechterhaltung des vaskulären Systems mitwirken [22]. Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist das Gen, welches für Angiopoietin-2 kodiert. Aus diesem Grund werden im Folgenden näher auf die Funktion von Ang-2 sowie Ang-1 eingegangen, die ihre biologische Wirkung über den Rezeptor Tie-2 vermitteln.



**Abb. 2: Schematische Darstellung von endothelialen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und ihren Liganden.**

Die strukturell unterschiedlichen Rezeptoren werden in die Tie-Rezeptoren und VEGF-Rezeptoren unterteilt. Intrazellulär ist allen Rezeptoren die Tyrosin-Kinase gemein. Die Aktivierung von Tie-1/2 induziert Signalkaskaden, die antiapoptotische Effekte sowie die Stabilität und Permeabilität von Gefäßen beeinflussen. (modifiziert nach [22])

### 1.2.1 Funktionen des Angiopoietin-Tie-1/Tie-2 Systems

Lange galt VEGF-A als einziger Wachstumsfaktor, der spezifisch an der Blutgefäßbildung beteiligt ist. Dieses Konzept änderte sich 1996 mit der Klonierung von Angiopoietin-1 [23], einem Ligand für die endothelial lokalisierte Tyrosinkinase Tie-2. Bereits ein Jahr später wurde basierend auf Homologiestudien Angiopoietin-2 isoliert [24]. Darüber hinaus identifizierte man durch Hybridisierungen mit Ang-1 und Ang-2 cDNAs das murine Ang-3 sowie das humane Ang-4 - zwei Moleküle, die als *interspecies* Orthologe bezeichnet werden. Diese stellen weitere Proteine dar, die an Tie-2 binden [25].

#### Rezeptor-Tyrosin-Kinasen Tie-1 und Tie-2

Die Tie-Rezeptoren, zu denen Tie-1 und Tie-2 (TEK) gehören, werden hauptsächlich in vaskulären Endothelzellen exprimiert und bestimmen somit die hohe Gewebsspezifität ihrer Liganden. Sie nehmen während der embryonalen Entwicklung eine zentrale Stellung beim Umbau des primären Gefäßplexus zu einem organisierten Gefäßsystem ein [26,27]. Die extrazelluläre Domäne der Tie-Rezeptoren besteht aus zwei Immunglobulin (Ig)-ähnlichen Bereichen, die durch drei EGF (*epidermal growth factor*)-ähnliche Domänen flankiert werden, gefolgt von drei Fibronektin III-ähnlichen Domänen. Die intrazelluläre Region der Tie-Moleküle enthält Tyrosinkinase-Domänen (Abb. 2) [26,27]. Die



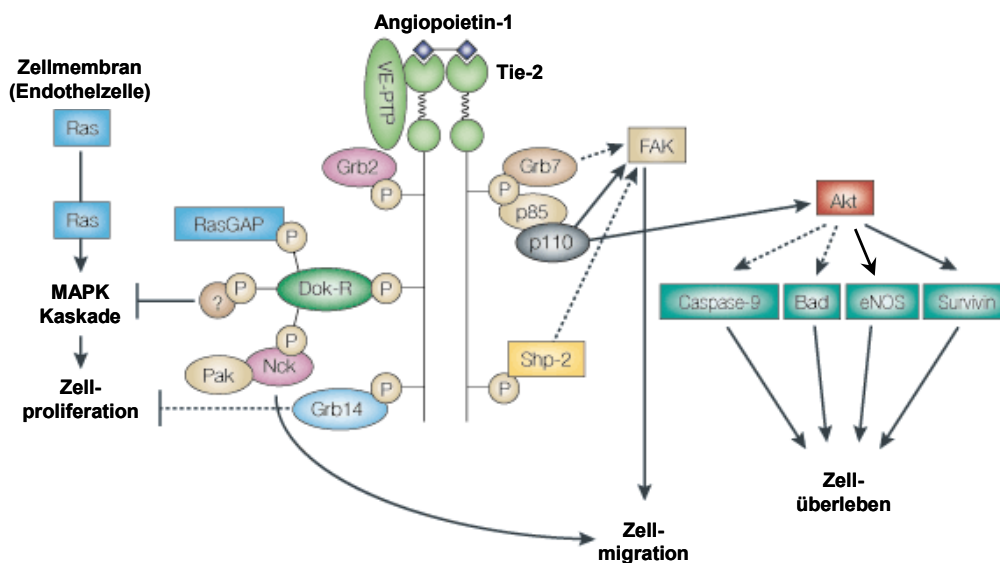
Rezeptoren werden sowohl während der Embryogenese als auch in ausdifferenzierten Organismen von Endothelzellen exprimiert [28].

*Tie-2* knock-out Mäuse, *tie-2*(-/-), sterben bereits während der frühen embryonalen Entwicklung zwischen dem Tag E9.5 und E12.5 als Folge einer unzureichenden Remodellierung des primären vaskulären Plexus [14,24,29,30]. Die Blutgefäßbildung erfolgt bei diesen Tieren in den frühen Stadien normal, jedoch reifen die Gefäße nicht aus und zeigen nur eine verminderte Assoziation mit Perizyten. Die hierarchische Aufteilung in große und kleine Gefäße ist nur unzureichend. Über die Tyrosinkinase Tie-2 wird demnach sowohl eine Stabilisierung der Gefäße als auch deren Funktion moduliert.

Durch die Rezeptordimerisierung ausgelöste Autophosphorylierung von Tie-2 werden unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden induziert, die antiapoptotische Effekte haben sowie auf die Zellproliferation und -migration wirken (Abb. 3). Durch die Assoziation der regulatorischen Untereinheit p85 der Phosphatidylinositol-3-OH Kinase (PI(3)K) wird diese aktiviert und als Folge die Serin/Threonin Kinase Akt aktiviert [22,31]. Akt führt über die Hemmung von proapoptotischen Proteinen sowie über die Aktivierung des Apoptose-Inhibitors Survivin [32] zu einem verstärkten Zellüberleben. Durch Aktivierung der Kinase FAK (*focal adhesion kinase*) wird die Zellmigration induziert [15].

Ein weiterer Tie-2 Signalweg wird durch die Aktivierung von Dok-R (*docking protein*) vermittelt. Phosphorylierte Proteine interagieren mit ras-GAP, Nck und Crk. Dabei handelt es sich um Signalmoleküle, die an Vorgängen der Zellmigration und Proliferation, der Reorganisation des Cytoskeletts und der Regulation des Ras Signalwegs beteiligt sind [33]. Proteine mit einer SH2 Domäne können über diese mit dem aktivierten Tie-2 interagieren. Dazu zählen Grb2, Grb7, Grb14 und Shp2 sowie die p85 Untereinheit der PI(3)-Kinase. Über diese Interaktion werden Signalwege beeinflusst, die für Zellmigration und Proliferation/Überleben verantwortlich sind [19].

Für die zweite RTK Tie-1 wurden bisher weder die Liganden noch der Signaltransduktionsweg identifiziert. Im Tiermodell hat die Inaktivierung von *tie-1* jedoch letale Folgen. Die phänotypischen Veränderungen *tie-1* defizienter Mäuse manifestieren sich erst nach 13.5 Tag des Embryonalstadiums (E13.5). Bis zu diesem Zeitpunkt verläuft die Gefäßbildung scheinbar normal, dann treten jedoch erste Zeichen für Ödeme, lokale Hämorrhagien sowie Blutgefäßrupturen auf. Die Tiere sterben aufgrund der Komplikationen zwischen E13.5 [34] und Geburt [29]. Die Schädigungen an den Gefäßen lassen auf eine Funktion von Tie-1 an der Aufrechterhaltung der Integrität des Endothels und dem Flüssigkeitsaustausch über die Kapillaren schließen. Doppelmutanten von *tie-1/tie-2* zeigen einen ähnlichen Phänotyp wie *tie-2* knock-out Tiere [35].

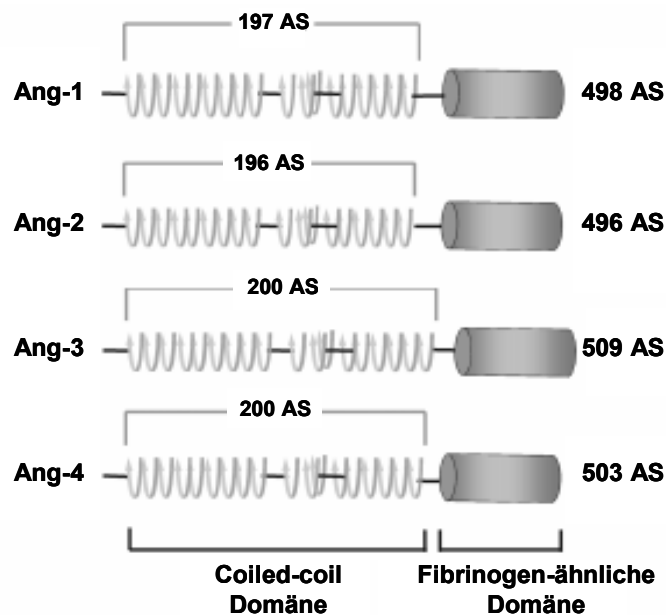


**Abb. 3: Tie-2 Signaltransduktion.**

Durch Bindung von Ang-1 an Tie-2 wird die intrazelluläre Domäne der Tyrosinkinase autophosphoryliert. Die regulatorische Untereinheit p85 der PI(3)-Kinase interagiert mit dem phosphorylierten Tie-2 Rezeptor und aktiviert die Kinase. Die folgende Stimulation der Serin/Threonine Kinase Akt korreliert mit einer Hochregulation von Survivin und einem gleichzeitigen Anstieg des Zellüberlebens. Alternativ fällt die Aktivierung der PI(3)-Kinase mit einer Stimulation der FAK und einer erhöhten Zellmigration zusammen. Darüber hinaus interagiert der aktivierte Tie-2 mit Dok-R. Durch diese Interaktion werden die Signalmoleküle RasGAP, Nck und Crk aktiviert, die an Vorgängen der Zellmigration und Proliferation, der Reorganisation des Cytoskeletts und der Regulation des Ras Signalwegs beteiligt sind. Nur die mit durchgehenden Pfeilen gekennzeichneten Signalwege sind bisher bewiesen. (modifiziert nach [22])

### Angiopoietin-1 und -2

Die Liganden der Tie Rezeptor-Tyrosin Kinasen, Ang-1 und Ang-2, sind sezernierte Proteine mit einer Größe von etwa 75 kDa. Zwischen beiden Proteinen besteht eine Sequenzhomologie von ca. 60% [24]. Angiopoietine zeichnen sich durch eine charakteristische Proteinstruktur aus, die in drei Domänen unterteilt werden kann: die N-terminale Region, welche keine Übereinstimmungen mit anderen bekannten Proteinen aufweist, gefolgt von einer *coiled-coil* C-Domäne sowie der carboxyterminalen F-Domäne, die große Ähnlichkeit mit Fibrinogen hat (*fibrinogen-like*) (Abb. 4) [23,36,37]. Über die C-Domäne wird die Homodimerisierung der Proteine vermittelt, welche Voraussetzung für die Aktivierung des Rezeptors ist, jedoch nicht für die Bindung des Liganden [38]. Ang-1 kann als Dimer an seinen Rezeptor binden, aber erst als Tetramer erfolgt die Rezeptoraktivierung durch Ang-1. Für die Rezeptorbindung ist die F-Domäne verantwortlich [36,39].



**Abb. 4: Aufbau der Angiopoietine.**

Die vier zur Angiopoietin-Familie gehörenden Moleküle haben eine ähnliche Struktur. Sie bestehen aus einer N-terminalen *Coiled-coil* Domäne sowie aus einer C-terminalen Fibrinogen-ähnlichen Domäne. AS – Aminosäure (modifiziert nach [37])

Ang-1 und Ang-2 binden mit in etwa gleicher Affinität an die extrazelluläre Bindungsdomäne von Tie-2, aber nur durch die Bindung von Ang-1 erfolgt eine Autophosphorylierung der intrazellulären Domäne des Rezeptors und somit dessen Aktivierung [23]. Nach Bindung von Ang-2 kommt es dagegen zu keiner Autophosphorylierung von Tie-2. Ang-2 agiert als natürlich vorkommender Antagonist im Angiopoietin-Tie-2 System [24]. *In vitro* Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass Ang-2 - je nach Dosis und Wirkzeit - ebenfalls in der Lage ist, Tie-2 als Agonist zu aktivieren [40].

Ein ähnliches Bild wie im *tie-2* Deletionsmodell findet man in *ang-1* defizienten Mäusen, die aufgrund von Defekten in der Blutgefäßbildung und der Entwicklung des Herzens bereits um den 12.5 Tag des Embryonalstadiums (E12.5) sterben [14]. Das Gefäßnetz ist in diesen Tieren nur schwach entwickelt und durch eine reduzierte Strukturierung gekennzeichnet. Bei diesen Tieren ist die Assoziation von Endothelzellen mit der Basalmembran und mit Perizyten schwach ausgebildet. Trotz eines ähnlichen letalen Phänotyps sterben *ang-1*(-/-) Mäuse erst ein bis zwei Tage später als *tie-2*(-/-) Mäuse [14]. Viel komplexer sind dagegen die phänotypischen Veränderungen von *ang-2* *knock-out* Mäusen, *ang-2*(-/-). Diese Tiere werden ohne offensichtliche Schädigungen geboren [41]. Das Blutgefäßsystem weist nur geringfügige Abnormalitäten auf. Abhängig vom genetischen Hintergrund entwickeln die Tiere jedoch innerhalb der ersten 14 Lebenstage eine tödliche chylöse Aszitis in Thorax und Abdomen als Folge noch ungeklärter lymphatischer Veränderungen [42]. Transgene Mäuse, die dagegen *ang-2* überexprimieren, spiegeln im Wesentlichen einen für sie tödlichen embryonalen Phänotyp wieder, der dem von *ang-1* und *tie-2* defizienten Tieren entspricht [23,24,36]. Die Übereinstimmungen zwischen dem *ang-1* *loss-of-function* Phänotyp und dem *ang-2* *gain-of-function* Phänotyp bestätigen das antagonistische Konzept zwischen diesen beiden Molekülen. Weiterhin kann man schlussfolgern,

dass aufgrund der letalen Folgen einer systemischen *ang-2* Überexpression, die Regulation von *ang-2* sowohl bezüglich der Dosis als auch des räumlich-zeitlichen Auftretens unter strenger Kontrolle stehen muss [43].

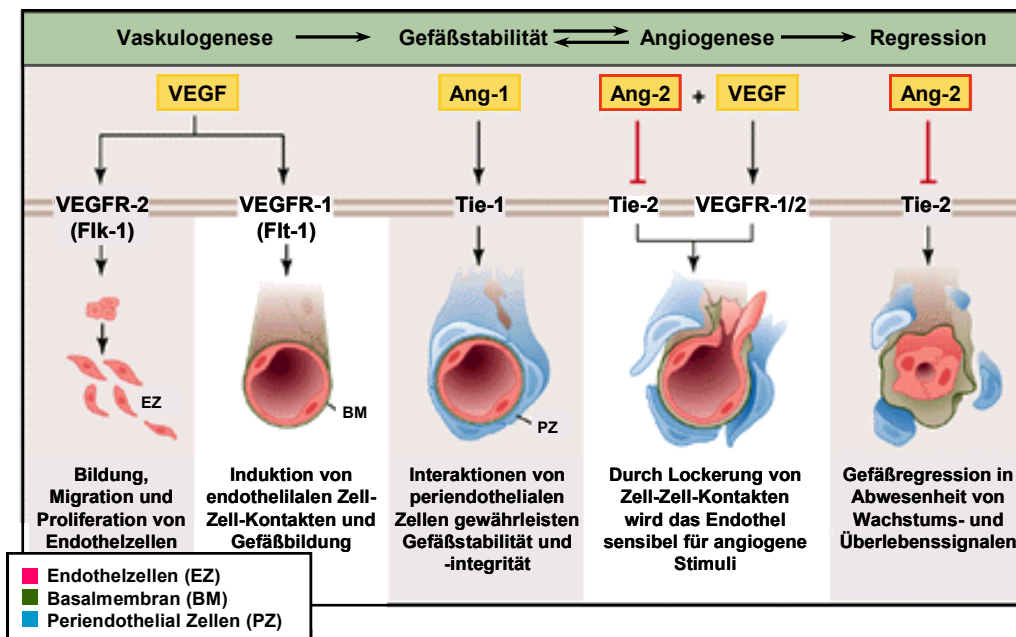
### 1.2.2 Regulation der Vaskulogenese und Angiogenese durch Angiopoietin-1 und -2 sowie VEGF-A

In den vorangegangenen Abschnitten wurde bereits über die Blutgefäßbildung und deren molekulare Mechanismen gesprochen. Im Folgenden soll vor allem das Zusammenspiel der Angiopoietine-1 und -2 mit dem endothelialen Wachstumsfaktor VEGF-A näher betrachtet werden. Für die Aufrechterhaltung des Gefäßsystems, die Blutgefäßbildung aber auch für die Gefäßregression ist die funktionelle Kooperation zwischen VEGF-A und den Angiopoietinen sowie ihren Rezeptoren notwendig (Abb. 5) [44]. Das Blutgefäßsystem befindet sich in einem ständigen dynamischen Zustand der Anpassung (*angioadaptation*), um den veränderten Bedürfnissen der Gewebe an Nährstoffen und Sauerstoff gerecht zu werden. Wesentliche Einflussgrößen der *angioadaptation* sind der Sauerstoffpartialdruck und die Wandschubspannung in den Gefäßen, die regulierend auf die Expression von *vegfr-A* und *ang-2* wirken [45].

Für die Vaskulogenese ist VEGF-A notwendig, welches durch Bindung an VEGFR-2 und dessen Aktivierung die Differenzierung der Angioblasten zu Endothelzellen induziert. Ebenso werden Migration und Proliferation von Endothelzellen und deren Zusammenschluss zu Kapillaren stimuliert.

Die Angiopoietine werden erst später während der Angiogenese aktiv. Über ihre Bindung an Tie-2 werden Blutgefäßreifung, Umstrukturierung und im ausdifferenzierten Gewebe die Homöostase der Gefäße reguliert. Dabei ist das gut ausbalancierte Verhältnis von Ang-1 zu Ang-2 wichtig. *Ang-1* wird während der Embryogenese und auch im adulten Organismus konstitutiv von perivaskulären Zellen in verschiedenen Geweben exprimiert. Durch die Ang-1 vermittelte Tie-2 Aktivierung werden periendotheliale Zellen rekrutiert, welche die neu gebildeten Gefäße von außen umkleiden und somit zur Gefäßstabilisierung führen. Diese Gefäße sind weniger sensitiv gegenüber mitogenen/angiogenen Faktoren; die Integrität des Gefäßbetts wird aufrecht erhalten [14]. Im Unterschied zur konstitutiven Expression von *ang-1* wird die Expression von *ang-2* stark reguliert. *Ang-2* wird nicht im ruhenden Gefäßbett exprimiert, sondern nur nach Aktivierung von Endothelzellen. Die Expression von *ang-2* beschränkt sich im Adulten auf das Ovar, die Uterusschleimhaut, Entzündungsorte oder die Wundheilung, also Gewebe, die aktive Angiogenese erfahren. Durch Blockierung der Tie-2 Signalkaskade wird das Gefäßbett aktiviert, da die Gefäßstrukturen sowohl durch Auflösung der EZM als auch durch Dissoziation perivaskulärer Zellen aufgelockert werden. In diesem Zustand sind die Endothelzellen empfänglicher für die Stimulation durch angiogene oder inflammatorische Signale. Interessant ist, dass sich die Wirkung von Ang-2 auf das Endothel durch eine duale Funktion in Abhängigkeit von VEGF-A auszeichnet. Beide Gene werden abhängig vom Sauerstoffpartialdruck und der Wandschubspannung reguliert. Unter hypoxischen Bedingungen und gleichzeitiger Verringerung der Blutströmung, die eine Unterversorgung widerspiegeln, werden *vegfr-A* und *ang-2* verstärkt exprimiert. Dieser Zustand begünstigt die Vergrößerung bestehender Gefäße und/oder das Gefäßwachstum durch Aussprossen, da das angiogene Potential von VEGF-A zum Tragen kommt. Bei Normoxie und

verringerten Strömung wird dagegen nur die Expression von *ang-2* induziert. In Abwesenheit von VEGF-A lösen sich die Gefäßstrukturen durch die Ang-2 vermittelte Wirkung auf und es kommt zur Gefäßregression. Sowohl VEGF-A als auch Ang-2 bedingen sich gegenseitig in ihren Funktionen. Die Konzentration von VEGF-A entscheidet über das Ergebnis des Ang-2 Signals. Aber auch Ang-2 hat Einfluss auf den VEGF-Signalweg. In Abwesenheit von Ang-2 kann VEGF-A stabilisierend auf Gefäße wirken (Abb. 5).



**Abb. 5: Regulation der Vaskulogenese und Angiogenese durch Angiopoietin (Ang)-1/2 und das VEGF (vascular endothelial growth factor)-System.**

Zwei Gruppen an Faktoren sind vorrangig an der Angiogenese beteiligt, die an spezifische Rezeptor-Tyrosin-Kinasen binden: Angiopoietine und VEGFs. Durch VEGFs werden zum einen während der Embryogenese die Bildung und Proliferation von Endothelzellen gefördert. Zum anderen wird über VEGF die Entstehung von Gefäßen induziert. Die Angiopoietine sind entscheidend für die Gefäßreifung und -regression, wobei Ang-1 die mesenchymale Proliferation und Differenzierung unterstützt sowie die Stabilität der Gefäße fördert. Dagegen wirkt Ang-2 in Gegenwart von VEGF destabilisierend auf die Gefäße und die Assoziation zwischen Endothelien und Perizyten. Dadurch wird die Gefäßneubildung durch Aussprossen begünstigt. In Abwesenheit von VEGF löst sich jedoch die Gefäßstruktur durch Ang-2 auf und vaskuläre Strukturen gehen verloren. (modifiziert nach [44])

### 1.3 Bedeutung von Angiogenese während pathologischer Zustände

Im adulten Organismus steht die Gefäßneubildung unter einer strengen Regulation und findet unter physiologischen Bedingungen nur während des weiblichen Reproduktionszyklus, bei Muskeltraining und bei der Wundheilung bzw. inflammatorischen Reaktionen statt [46]. Unter pathologischen Bedingungen dagegen ist Angiogenese durch eine anormale Gefäßbildung (verstärkte oder verringerte Angiogenese) gekennzeichnet. Im Gegensatz zur physiologischen Angiogenese läuft die angiogene Kaskade weniger kontrolliert ab. Dies führt zur Ausbildung von primär strukturell und funktionell unzureichenden Gefäßen. Vor allem im Zusammenhang mit neoplastischen Erkrankungen wird die pathologische Vaskularisation diskutiert, weil sie eine Voraussetzung für weiteres Wachstum der Tumoren und deren Metastasierung ist [47]. Daneben existieren weitere zahlreiche Erkrankungen, die

mit einer Neovaskularisation assoziiert sind [17]. Bei chronisch entzündlichen Krankheiten ist die Ausbildung von neuen Blutgefäßen eine Begleiterscheinung, die offenbar durch die Entzündung ausgelöst wird [48]. So stellt sie bei der Rheumatoiden Arthritis ein Schlüsselereignis dar, das die Zerstörung von Knorpel und Knochen fördert [49]. Eine Spätfolge des Diabetes mellitus ist die Diabetische Retinopathie, welche sich durch das Einsprossen von Gefäßen aus der Retina in den Glaskörper auszeichnet. Dies führt zu Einblutungen und in Folge zum Erblinden der betroffenen Patienten [50].

### 1.3.1 Tumorassoziierte Angiogenese und Angiopoietin-2

Wie in normalen Geweben sind die Zellen in Tumoren auf eine adäquate Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen sowie den Abtransport von Stoffwechselprodukten angewiesen und somit von der Blutversorgung abhängig. Der Zugang zum bestehenden Gefäßsystem bzw. die Ausbildung neuer Gefäße ist ein limitierender Schritt in der Tumorprogression [51]. Dieses Ziel kann von Tumoren auf unterschiedlichen Wegen erreicht werden (Abb. 6). Nach dem klassischen Modell wird in der tumorassoziierten Angiogenese das avaskuläre Wachstumsstadium, in dem sich der Tumor im „Ruhezustand“ befindet und nicht an Größe zunimmt, vom vaskulären durch den *angiogenic switch* getrennt [52], der sich durch die Induktion von angiogenen Vorgängen auszeichnet. Der Tumor geht dadurch von der ruhenden avaskulären in die vaskuläre proliferierende Phase über, die sich durch ein exponentielles Wachstum und Metastasierung des Tumors auszeichnet (Abb. 6A) [9,10,14]. Außerdem können Tumorzellen entlang existierender Blutgefäße des Wirts durch *host vessel co-option* wachsen und sind anfänglich nicht von Induktion der Angiogenese in ihrem Wachstum abhängig (Abb. 6B) [53,54]. Darüber hinaus sind zirkulierende endotheliale Vorläuferzellen aus dem Knochenmark an der Tumorangiogenese beteiligt [55,56].

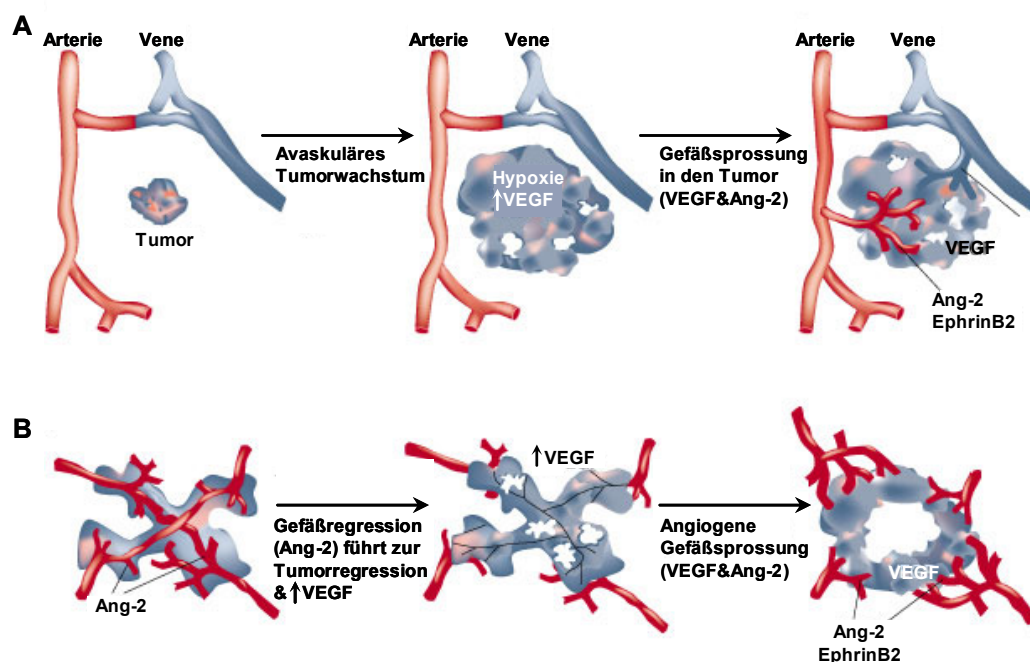
Ebenso wie unter physiologischen Bedingungen wird die Gefäßbildung in Tumoren durch eine Vielzahl an Faktoren reguliert. Im Zusammenspiel mit VEGF nimmt Ang-2 eine prominente Rolle in der tumorassoziierten Angiogenese ein [47]. Dabei ist die proangiogene Funktion von Ang-2 im Gegensatz zu Ang-1 klar belegt. In den unterschiedlichsten humanen Tumorentitäten wurde eine erhöhte Expression von *ang-2* detektiert. Dazu zählen das Magenkarzinom [57,58], das Kolonkarzinom [59], das hepatozelluläre Karzinom [60] und das NSCLC (*non-small cell lung cancer*) [61].

Die Funktion von Ang-1 wird hingegen sehr kontrovers diskutiert. Eine Überexpression dieses Angiogenesefaktors in experimentellen Tumoren hatte eine Gefäßstabilisierung durch verstärkte Rekrutierung von Perizyten und glatten Muskelzellen und damit eine geringere Tumorgroße sowie einen Wachstumsstillstand zur Folge [59,62,63]. Andere Untersuchungen weisen jedoch auf eine proangiogene Wirkung von Ang-1 in Tumoren hin [64,65]. Wie unter physiologischen Bedingungen hat Ang-1 vorrangig eine stabilisierende Wirkung auf die Gefäße.

Dem gegenüber steht die Initiation des Gefäßwachstums durch Ang-2 aufgrund seiner destabilisierenden Wirkung auf das Endothel und der damit verbundenen Dissoziation von Perizyten [58-60]. In der Tumorangiogenese wirkt Ang-2 auf unterschiedliche Weise: Zum einen exprimieren Tumorzellen, die entlang von bestehenden Blutgefäßen wachsen kein *vegf-A*, stattdessen induzieren sie in den Wirtsfäßen die Expression von *ang-2*. Dies führt zur Gefäßdestabilisierung und -regression. Zum

anderen steigt mit zunehmender Tumorgöße und damit verbundenen metabolischen Ansprüchen die *vegf*-Expression. Durch die zeitgleiche Expression von *ang-2* sind die Endothelzellen sensibilisiert für das angiogene VEGF-Signal, wodurch die Vaskularisation des Tumors einsetzt. Die anscheinend unkontrollierte *ang-2* Expression und damit verbundene Blockade der stabilisierenden Ang-1 Wirkung auf die Blutgefäße trägt wesentlich zur starken Durchlässigkeit der Gefäße im Tumor bei. Die *ang-2* Expression wird in Tumoren oft noch vor *vegf* [66] induziert und ist einer der frühesten Marker von tumorassoziierter Angiogenese. Unterstützt wird die Bedeutung von Ang-2 in der tumorassozierten Angiogenese durch ein Xenotransplantat-Mausmodell, in dem durch subkutane Injektion von humanen Tumorzellen die Bildung von Tumoren induziert wurde. Die Gabe von selektiven Ang-2 Inhibitoren führte zur Inaktivierung des endogenen Ang-2 und zum supprimierten Tumorwachstum in den Mäusen [67].

Über das Verhältnis von Ang-1 zu Ang-2 ist es möglich für einige Tumorentitäten (z.B. Magen-, Blasen-, Prostatakarzinom, NSCLC) eine Aussage zur klinischen Prognose zu treffen [58,61,68,69]. Eine Verschiebung zugunsten von Ang-2 korreliert mit einer verstärkten Tumorangiogenese. Folglich wird eine erhöhte Ang-2 Konzentration als Marker für eine schlechtere Prognose assoziiert mit einer erhöhten Vaskularisation der Tumoren, fortgeschrittenem Krankheitsstadium, Lymphknoteninvasion und einer geringeren Überlebensrate angesehen.



**Abb. 6: Modelle zur Tumorangiogenese.**

A) Die meisten Tumoren wachsen avaskulär bis zu einer Größe, bei der die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen über Diffusion nicht mehr ausreichend ist. Durch Expression angiogener Faktoren wie *ang-2* und *vegf* wird Gefäßsprossung initiiert. Das sich ausbildende Gefäßnetz innerhalb des Tumors sichert dessen exponentielles Wachstum. B) Viele Tumoren und vor allem Metastasen wachsen als gut durchblutete Gebilde durch Besiedlung von Wirtsgefäßen durch Tumorzellen (*host vessel co-option*). Das Wachstum entlang eines bereits bestehenden Gefäßnetzes sichert die Versorgung des Tumorgewebes. Als Antwort auf das Tumorwachstum steigt die *ang-2* Expression in den betroffenen Gefäßen an, die daraufhin an Struktur verlieren. Die Gefäßregression führt zur Unterversorgung des nun avaskulären Tumors. Im hypoxischen und nekrotischen Tumor wird verstärkt *vegf* exprimiert. Angiogenese wird induziert und ein Gefäßnetz ausgehend von *host vessels* (Wirtsgefäßen) zur Versorgung des Tumorgewebes aufgebaut. (modifiziert nach [21])

## 1.4 Allgemeine transkriptionelle Mechanismen

Entscheidend für die Regulation der Genexpression von angiogenen Faktoren wie den Angiopoietinen sind vor allem transkriptionelle Mechanismen. Aufgrund der Ausstattung aller Zellen vielzelliger Organismen mit identischem genetischem Material müssen die Unterschiede zwischen den verschiedenen Zellen in Struktur und Funktion auf Basis der Genexpression reguliert werden. Diese Regulation erfolgt auf verschiedenen Ebenen, z.B. Transkription, mRNA-Prozessierung, Transport und Stabilität der mRNA sowie durch Translation oder Aktivität der translatierten Proteine. Die Transkription stellt dabei eine der wichtigsten Ebenen dar. Entgleisungen der transkriptionellen Regulation können gravierende Folgen haben, die sich etwa in Fehlbildungen oder bösartigen Erkrankungen manifestieren.

Die Kontrolle der Transkription wird durch regulatorische Proteine, die Transkriptionsfaktoren (TF) vermittelt. Aufgrund ihrer Bindung an bestimmte DNA-Abschnitte wie dem basalen Promotor sowie dem proximalen und distalen Promotorbereich haben sie direkten Einfluss auf die Transkription. Dabei wird zwischen allgemeinen (*general transcription factors*, GTF) und den spezifischen Transkriptionsfaktoren unterschieden [70,71].

In eukaryotischen Zellen werden alle proteinkodierenden Gene von der RNA-Polymerase II transkribiert. Voraussetzung für die Transkription ist die Ausbildung eines stabilen Präinitiationskomplexes zwischen der Polymerase und der DNA. Mit Hilfe von GTFs erfolgt schrittweise die Bildung und Bindung des Komplexes in der Promotorregion in der Nähe des Transkriptionsstartpunktes. Der Proteinkomplex TFIID bindet an die TATA-Box, die 23 bis 40 bp oberhalb des Transkriptionsstartpunktes liegt [72]. TFIID setzt sich aus TBP (*TATA-binding protein*) und TAFs (*TBP associated factors*) zusammen. Über GTFs wird somit die Transkriptionsinitiation reguliert [73]. Promotoren von proteinkodierenden Proteinen ohne TATA-Box sind ebenfalls auf die Gruppe der GTFs angewiesen. Da TBP jedoch bei diesen Genen nicht spezifisch binden kann, sind Hilfsfaktoren notwendig die als Vermittler wirken.

Der Präinitiationskomplex ist ausreichend für die basale Promotoraktivität *in vitro*, jedoch sind *in vivo* weitere regulatorische Proteine wie z.B. spezifische Transkriptionsfaktoren notwendig. Sie sind wesentlich an der konstitutiven sowie an der induzierbaren Genexpression beteiligt und fördern die Stabilität des Präinitiationskomplexes. Durch Bindung an *cis*-regulatorische Bereiche auf der DNA, die sowohl in der Nähe des basalen Promotors (proximale Elemente) als auch einige hundert Basenpaare oberhalb der basalen Promotorregion (distale Elemente) lokalisiert sind, haben die TFs Auswirkungen auf die Genexpression. Durch Bindung an *enhancer*-Elemente wird die Transkription positiv beeinflusst, dagegen wird über *silencer* die Repression vermittelt [71,74].

Transkriptionsfaktoren weisen sich durch einen modularen Aufbau unterschiedlicher unabhängiger funktioneller Domänen aus. Die sequenzspezifische Bindung der TFs wird über die DNA-Bindedomäne (DBD) ermöglicht [75]. Über die Aktivierungsdomäne (AD) interagieren die Transkriptionsfaktoren mit dem Präinitiationskomplex am basalen Promotor und vermitteln die Initiation bzw. eine Steigerung der Transkription. Aufgrund dieser Interaktion wird der Präinitiationskomplex an den basalen Promotor rekrutiert oder über eine Konformationsänderung die Transkription initiiert.

Die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren stellt oft das Ende von Signaltransduktionswegen dar. Das Vorhandensein von Bindungsstellen verschiedener TFs in den regulatorischen Bereichen von Genen



ermöglicht über das Zusammenspiel unterschiedlicher TFs eine fein abgestimmte, den Anforderungen entsprechende Genexpression [76].

## 1.5 Epigenetische Vorgänge in der Genregulation

Wie im letzten Abschnitt beschrieben, sind für die Genexpression Transkriptionsfaktoren entscheidend, die über ihre Bindung an die DNA zu einer transkriptionellen Aktivierung oder Repression führen. Jedoch sind diese nicht ausreichend, um das Spektrum der Genaktivität in Zellen zu erklären. Die Regulation muss auf zumindest einer weiteren Ebene erfolgen [77]. DNA liegt nicht als nacktes Molekül in der Zelle vor, sondern ist mit den Histon-Proteinen assoziiert, mit denen sie eine komplexe Struktur bildet - das Chromatin. Chemische Modifikationen der DNA oder der Histone führen zu Veränderungen der Chromatinstruktur. Diese sterischen Änderungen haben Einfluss auf die Zugänglichkeit des Transkriptionskomplexes und werden unter dem Begriff Epigenetik zusammengefasst. Russo *et al.* beschrieben Epigenetik als „Studie von mitotisch und/oder meiotisch vererbaren Änderungen der Genexpression, die nicht durch Änderungen der DNA Sequenz zu erklären sind“ [78]. Zwei vorrangige Mechanismen in der Epigenetik sind die Methylierung von CpG-Inseln und die Modifikation von Histonen.

### 1.5.1 DNA-Methylierung von CpGs

In Eukaryoten ist die DNA-Methylierung von Cytosin-Resten ein wesentlicher epigenetischer Mechanismus, der in die Transkriptionsregulation eingreift. Sehr häufig ist diese Modifikation mit der Repression von Gentranskription verbunden. Betroffen von der Modifizierung sind ausschließlich Cytosinreste in dem Dinukleotid-Palindrom CpG. Gesteuert wird die kovalente Bindung eines Methylrests an das 5'-C-Atom von Cytosin durch DNA-Methyltransferasen (DNMT). Als Methylgruppendonor fungiert S-Adenosyl-Methionin [79]. Im humanen Genom liegen 70 bis 80% aller CpGs methyliert vor [77], ca. 1% des gesamten Genoms [78,80]. Aufgrund des erwarteten Anteils des GC-Dinukleotids entspricht das jedoch nur einem Fünftel der hypothetischen Häufigkeit und ist somit unterrepräsentiert. Ausnahmen sind CpG-Inseln mit einem erhöhten CpG-Anteil [81]. Diese kurzen DNA-Abschnitte sind vor allem in Promotorbereichen und im ersten Exon von Genen zu finden. Die von Gardiner-Garden und Frommer [82] erstmals aufgestellte Definition für CpG-Inseln wurde weiterentwickelt und ist stringenter in ihren Anforderungen. CpG-Inseln sind demnach Bereiche mit einer Länge  $\geq 500$  bp, einem G+C Gehalt  $\geq 55\%$  und einem Verhältnis von beobachteter zur erwarteter CpG-Häufigkeit von  $\geq 0,65$  [83].

Es gibt verschiedene Mechanismen, welche die Transkriptionshemmung durch DNA-Methylierung erklären. Auf einem direkten Weg kann durch Methylierung die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA durch methylierte CpGs in ihren Bindungssequenzen verhindert werden. In diese Gruppe fallen Transkriptionsfaktoren wie AP-2, c-Myc, E2F oder NF $\kappa$ B [84,85]. Andere Transkriptionsfaktoren wie z.B. Sp1, CTF und YY1 sind nicht sensitiv gegenüber DNA-Methylierung und binden methylierungsunabhängig. Da nur eine geringe Anzahl an Transkriptionsfaktoren sensitiv gegenüber

Methylierung ist, wird diesem Mechanismus eine untergeordnete Rolle in der Genexpressionskontrolle zugeteilt [86].

Ein weiterer Mechanismus zur Transkriptionshemmung wird durch methyl-CpG-bindende Proteine (MBD1 bis 4 sowie MeCP-2) vermittelt, die Bestandteile von Repressorproteinkomplexen sind. Diese binden spezifisch an methylierte CpGs [87,88]. Zum einen wird eine sterische Blockade der Bindung von Transkriptions-Aktivator-Komplexen herbeigeführt. Zum anderen beruhen die hemmenden Eigenschaften auf einer Assoziation mit Proteinen wie z.B. Histondeacetylasen (HDAC) [89,90], die durch Deacetylierung von Histonresten eine Kondensation des Chromatins bewirken. Diese Struktur ist für den Transkriptionsapparat nur schwer zugänglich und betroffene Gene werden nicht transkribiert [91].

### **1.5.2 Modifikation von Histonen**

Die Struktur des Chromatins aus DNA, Histonen und Nicht-Histon-Proteinen ist sehr komplex. Eine strukturelle Änderung des Chromatins steht in engem Zusammenhang mit der Regulation der Transkription. Kondensiertes Chromatin ist mit einer transkriptionellen Inaktivierung verbunden. Dagegen sind aktive Gene in Bereichen der offenen Chromatinstruktur zu finden [92,93]. Bereits 1964 postulierten Allfrey *et al.* [94], dass die Modifikation der Histone durch Acetylierung Einfluss auf die Genexpression hat. Neben der Acetylierung existieren noch weitere posttranslationelle Histon-Modifizierungen durch Methylierung, Phosphorylierung oder Ubiquitinierung [95,96].

Die Acetylierung von Histonen ist der bisher am besten verstandene Mechanismus der Chromatinmodifikation. Durch kovalente Acetylierung der N-terminalen Enden von Lysinresten in den Histonen kommt es zu einer Strukturänderung und Auflockerung des Chromatins, welche den Zugang zur DNA erleichtern. Eine Deacetylierung führt dagegen zu einer kompakteren Chromatinstruktur und somit zu einer verminderten Interaktion mit funktionellen Proteinen, die zum Beispiel mit der Transkription in Verbindung stehen [97]. Das Gleichgewicht zwischen diesen Zuständen wird durch die Enzymgruppen der Histonacetyltransferasen (HAT) und den Histondeacetylasen hergestellt [98].

Bei der Untersuchung epigenetischer Mechanismen ist zu beachten, dass DNA-Methylierung dominant gegenüber der Histon-Acetylierung ist. Die Reexpression von Genen ist demnach nur möglich, wenn zuerst die Methylierung inhibiert wird. Eine initiale Behandlung mit demethylierenden Reagenzien (Azacytidine, Decitabine), gefolgt von Inhibitoren der HDACs (Trichostatin A) kann zu additiven oder synergistischen Effekten in der Untersuchung von transkriptionell ruhig gestellten Genen führen [99,100].

## 1.6 Zielsetzung

Angiogenese, der Vorgang der Blutgefäßbildung aus bereits bestehenden Gefäßen, hat im Zusammenhang mit der Entstehung von Tumoren oder Erkrankungen wie der Diabetischen Retinopathie eine große Bedeutung. Angiopoietin-2, welches destabilisierend auf das Endothel wirkt, nimmt neben den weiteren Komponenten des Angiopoietin/Tie-Systems und VEGF-A eine Schlüsselposition unter den Mediatoren der angiogenen Kaskade ein. Eine therapeutische Intervention am Angiopoietin/Tie-System ist daher ein viel versprechender Angriffspunkt für eine antiangiogene Therapie. Trotz der Relevanz von *ang-2* im Zusammenhang mit pathologischen Veränderungen des Blutgefäßsystems ist dessen transkriptionelle Regulation bisher nur unzureichend untersucht worden. Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher verschiedene Aspekte der Regulation der *ang-2* Expression näher betrachtet werden.

Aufgrund des streng regulierten räumlich-zeitlichen Auftretens von Ang-2 wurden mögliche epigenetische Mechanismen der Genregulation untersucht, welche die transkriptionelle Regulation von *ang-2* beeinflussen. Dabei wurde der Ansatz einer explorativen *Microarray*-Analyse in Verbindung mit der *Real-Time* PCR gewählt.

Weiterhin sollte die transkriptionelle Regulation des humanen *ang-2* in endothelialen Zellsystemen untersucht werden. Im Vordergrund dieser Arbeit standen die Identifikation von regulatorischen Promotorelementen und die Identifikation von Transkriptionsfaktoren, welche in diesen Bereichen binden sowie die Charakterisierung ihrer funktionellen Relevanz. Grundlage für diesen Teil der Arbeit war die Klonierung des 5'-flankierenden Genbereichs des *ang-2* sowie die Herstellung von geeigneten Reportergenkonstrukten.

## 2 Material und Methoden

Alle verwendeten Grundchemikalien, Lösungsmittel, Puffersubstanzen sowie Detergenzien wurden von der Firma Difco (Beckton Dickinson, Sparks, MD, USA), Merck (Darmstadt), Carl Roth GmbH (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim) bezogen und werden in der folgenden Darstellung nicht einzeln aufgeführt. Sämtliche Primer und Oligonukleotide wurden von TIB Molbiol GmbH (Berlin) synthetisiert. Die Sequenzierungen wurden von AGOWA GmbH (Berlin) durchgeführt.

### 2.1 Gentechnische und molekularbiologische Methoden

#### 2.1.1 Agarosegelelektrophorese

Agarosegelelektrophorese ist eine Standardmethode zur analytischen und präparativen Auftrennung von Nukleinsäuren nach ihrer Molekülgröße. Die Auftrennung erfolgt dabei in horizontalen Agarosegelen unterschiedlicher Dichte (1 bis 2,5%), welche abhängig von der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente ausgewählt wird.

Zur Herstellung der Gele wurde die notwendige Menge an Agarose in 1xTBE Puffer aufgekocht und zur späteren Visualisierung der Nukleinsäuren mit Ethidiumbromidlösung (0,4 µg/ml) versetzt. Die Proben wurden vor dem Auftrag aufs Gel mit Ladepuffer ( $\frac{1}{6}$  des Gesamtvolumens) versetzt. Bei einer Spannung von 10 V/cm erfolgte die Auftrennung der Nukleinsäuren.

Die Dokumentation der Gele erfolgte unter UV-Licht im *Multimage™ Light Cabinet* und der Software *AlphaDigiDoc™* AD-1200 Version 3.2.1 (Alpha Innotech Corporation, Biozym Scientific GmbH, Oldendorf).

#### 2.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wird über die Messung der optischen Dichte (OD) im Spektrophotometer (UV Mini 1240, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Proben wurden in ddH<sub>2</sub>O gelöst und in einer 1cm dicken Quarzküvette gemessen. Voraussetzung für diese Methode ist die Annahme, dass die OD von 1 gemessen bei 260 nm in ddH<sub>2</sub>O einer 50 µg/ml dsDNA bzw. 40 µg/ml RNA entspricht:

$$c [\mu\text{l} / \text{ml}] = OD_{260} \times V \times \varepsilon$$

$c$  = Konzentration

$V$  = Verdünnungsfaktor

$\varepsilon$  = Extinktionskoeffizient (dsDNA 50, RNA 40)

Zusätzlich wurde die Reinheit der Nukleinsäuren durch die Bestimmung des Quotienten von  $OD_{260}/OD_{280}$  ermittelt. Der Idealwert für wässrige Nukleinsäurelösungen liegt bei 1,8 bis 2,0. Werte <1,8 weisen auf Verunreinigungen mit Proteinen hin.

### 2.1.3 Manipulation von DNA

#### **Verdau von DNA**

Zur Restriktion von DNA wurden die Enzyme der Firma Invitrogen GmbH (Karlsruhe) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Dabei wurde die DNA mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen bei 37°C inkubiert. Bei Inkompatibilität von Endonukleasen erfolgten sequentielle Verdaue. Die DNA wurde in diesem Fall nach dem ersten Verdau gefällt und in einem erneuten Ansatz mit der zweiten Endonuklease verdaut.

#### **Dephosphorylierung von DNA-Enden**

Durch den Restriktionsverdau von Plasmiden mit nur einer Endonuklease entstehen kompatible Enden, die miteinander ligieren können. Um dies zu verhindern, wurde die linearisierte Vektor-DNA dephosphoryliert. Nach dem Verdau wurde dem Ansatz eine Einheit der Phosphatase SAP (*shrimp alkaline phosphatase*, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) zugesetzt und bei 37°C für 30 min inkubiert. Die Phosphatase wurde anschließend bei 65°C für 15-20 min hitzeinaktiviert.

#### **Isolation von DNA aus Agarosegelen**

Die Isolation von DNA-Fragmenten und linearisierten Plasmiden aus Agarosegelen erfolgte mittels QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden) nach Herstellerangaben. Die elektrophoretisch aufgetrennten Banden wurden mit einem sterilen Skalpell unter UV-Licht aus den Agarosegelen ausgeschnitten und folgend präpariert.

#### **Ligation**

Während der Ligation werden gezielt DNA-Fragmente miteinander über eine Phospho-Esterbindung verbunden. Das Enzym Ligase katalysiert dabei in Gegenwart des entsprechenden Kofaktors die Verknüpfung von zwei kompatiblen DNA-Enden, sodass sich wieder ein ringförmiges Plasmid ergibt, welches anschließend in Bakterienzellen transformiert werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde die T4-DNA Ligase (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) eingesetzt. In einem Gesamtvolumen von 10 µl unter Einsatz von 1 µl T4-DNA Ligase und 2 µl 5 x Puffer wurden das linearisierte Plasmid- und die Insert-DNA vermischt und bei 16°C über Nacht inkubiert. Um eine optimale Ligation zu ermöglichen, lag das Verhältnis von Insert- und Vektor-DNA im Ansatz bei 3:1.

#### **Herstellung von chemisch kompetenten Zellen**

Zur Herstellung kompetenter Zellen aus dem *E.coli* Stamm XL1-Blue (Stratagene, USA) wurden 500 ml LB-Medium mit 5 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> zwischen 0,5 und 0,6 bei 37°C unter Schütteln herangezogen. Die Zellen wurden bei 5 000 rpm und 4°C für 10 min sedimentiert. Nach Verwerfen des Überstands wurden die Zellen in eiskalter 0,1 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Sedimentation konnten die Zellen in 10 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-15%-Glycerol-Lösung aufgenommen werden. Aliquots der kompetenten Zellen wurden bis zur Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

### Transformation

Ein hoher Salzgehalt der DNA-Lösung kann die Transformationseffizienz beeinflussen. Durch eine Fällung der Ligationsansätze mit n-Butanol können überschüssige und störende Salze entfernt werden. Dazu wurde die DNA-Lösung mit der fünffachen Menge n-Butanol gemischt, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde nach dem Waschen mit 70% Ethanol luftgetrocknet, in ddH<sub>2</sub>O gelöst und anschließend für Transformationen verwendet.

Je Transformationsansatz wurden 50 µl kompetente *E.coli* Zellen langsam auf Eis aufgetaut. Um die Transformationseffizienz zu erhöhen, wurden die Zellen mit 1,75 µl/ 100 µl Zellen 1,42 M β-Mercaptoethanol versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nachdem Zellen und das einzubringende Plasmid (Ligationsansatz) miteinander vermischt wurden, erfolgte eine weitere Inkubation für 30 min auf Eis. Zur Transformation wurden die Ansätze einem Hitzeschock für 45 s bei 42°C ausgesetzt, anschließend auf Eis für 2 min heruntergekühlt, mit vorgewärmtem LB-Medium gemischt und für mindestens 30 min bei 37°C geschüttelt. Auf Selektions-LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika wurden 50 bis 150 µl der Transformationsansätze ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

**Tab. 1: Bakterienstämme**

Name	Genotyp/ Beschreibung	Quelle/ Referenz
<i>E.coli</i> XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI</i> <sup>d</sup> ZΔM15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> )]	Stratagene, La Jolla, CA, USA
<i>E.coli</i> DH5α	F- $\phi$ 80/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ( <i>lacZYA-argF</i> )U196 <i>recA1 endA1</i> <i>hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ</i> <sup>-</sup>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

### Mini Plasmid DNA Präparation

Für die Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien im kleinen Maßstab wurde das JETquick® *Plasmid Miniprep Spin Kit* (Genomed GmbH, Löhne) eingesetzt. Die Methode basiert auf der alkalischen Lyse. Zur Generierung einer ausreichenden Plasmidmenge wurden ausgewählte Klone nach der Transformation mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in je ein Röhrchen mit 5 ml antibiotikahaltigem LB-Medium überführt. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C unter Schütteln, wurden je 4 ml Bakteriensuspension bei 12 000 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Plasmide nach Herstellerangaben aus den Bakterienpellets isoliert.

Zur Überprüfung der Klonierung wurden je 2 µg der Plasmide zur Sequenzierung eingeschickt. Die restliche Bakteriensuspension wurde für max. zwei Wochen bei 4°C gelagert und bei einem positiven Sequenzierungs-Ergebnis als Ausgangsmaterial für eine Maxi Plasmid Präparation verwendet.

### Maxi Plasmid DNA Präparation

Um eine größere Menge endotoxinfreier DNA zur Transfektion eukaryotischer Zellen aus *E.coli* zu gewinnen, wurde das JETstar® 2.0 *Maxi Kit* (Genomed GmbH, Löhne) verwendet. 100 bis 200 ml LB-Medium mit Antibiotika wurden aus einem Glycerolstock mit *E.coli* angeimpft und über Nacht kultiviert.

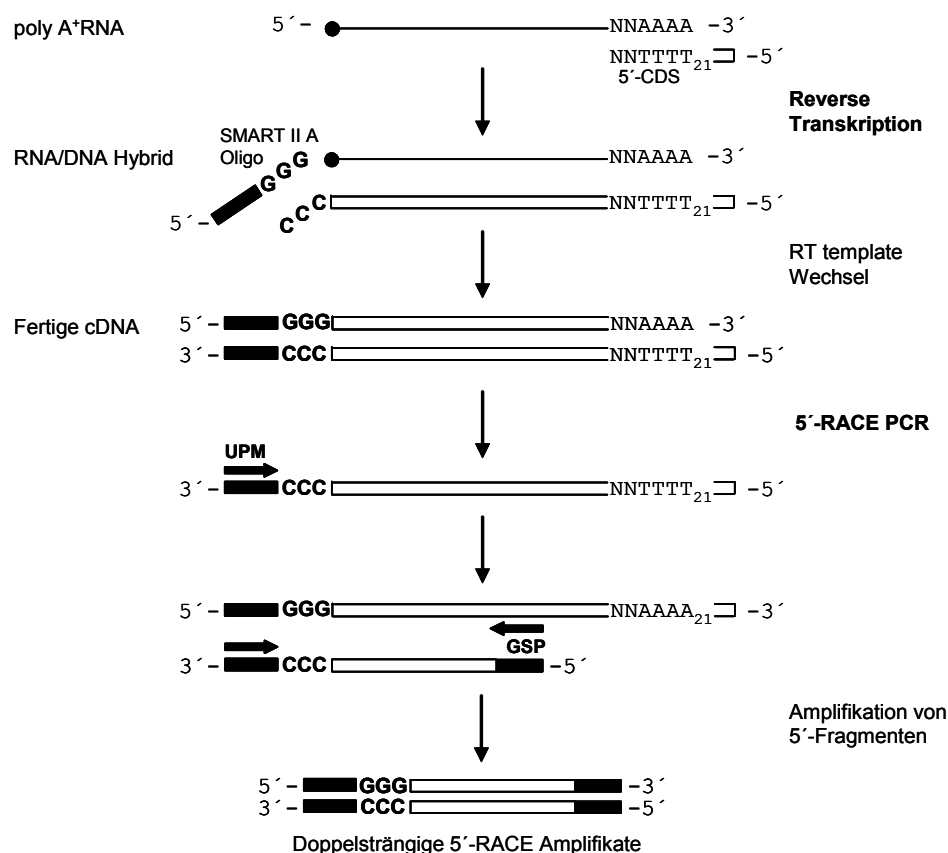
Die Bakteriensuspension wurde in Zentrifugengefäßen für 15 min bei 3 000 rpm und 4°C sedimentiert. Die Bakterienpellets wurden nach Herstellerangaben aufgearbeitet und das isolierte Plasmid in 200 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### 2.1.4 Präparation genomischer DNA

Zur Klonierung von *ang-2* wurde genomische DNA aus AGS Zellen präpariert. Unter Verwendung des *Genomic Buffer Sets* sowie der *20/G Genomic-tip* (Qiagen GmbH, Hilden) und einer Proteinase K Lösung (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) wurde die genomische DNA aus 5x10<sup>6</sup> Zellen nach Herstellerangaben isoliert.

#### 2.1.5 Rapid Amplification of cDNA-Ends (RACE)

Die Methode zur Amplifikation von 5'- bzw. 3' Enden unbekannter mRNAs wurde erstmals von Frohman *et al.* 1988 [101] beschrieben. Mittels dieser PCR-basierten Methode lassen sich unbekannte 5'- oder 3'- Enden eines Gens amplifizieren, wenn die komplementäre DNA (cDNA) nur partiell bekannt ist. Voraussetzung ist das Vorhandensein einer qualitativ hochwertigen RNA, aus der durch eine reverse Transkription cDNA hergestellt werden kann.



**Abb. 7: Schematische Darstellung der 5'-RACE.**

UPM - Universeller Primermix, GSP - Genspezifischer Primer. (nach SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit User Manual, Clontech USA)

In dieser Arbeit wurde das SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA *Amplification Kit* (Clontech, USA) für die 5'-RACE verwendet. Bei der SMART-Erststrangsynthese der mRNA werden modifizierte Oligo(dT)-Primer (SMART-Oligonukleotide) und eine MMLV-Reverse Transkriptase eingesetzt. Die modifizierte Reverse Transkriptase verfügt über eine Terminale-Transferase-Aktivität. Erreicht die reverse Transkriptase das 5'-Ende der RNA, so werden einige Desoxy-Cytidin hinzugefügt. Im Ansatz befinden sich zudem die SMART-Oligonukleotide, die am 3'-Ende Oligo(dG) tragen. Diese binden an den Oligo(dC)-Schwanz des neusynthetisierten Erststrangs, wobei der Überhang des SMART-Oligos als verlängertes Matritze für die Reverse Transkription dient. In der nachfolgenden PCR kann das SMART-Oligo als 5'-Primer zusammen mit einem genspezifischen 3'-Primer genutzt werden, um das 5'-Ende des Gens zu amplifizieren (Abb. 7).

Die 5'-Enden der mRNA aus HMEC-I und MKN-45 Zellen wurden nach den Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben und anschließend unter Verwendung des SMART *Universal Primer A Mix* (UPM) *long* (5-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3) und den genspezifischen Oligonukleotiden GSP-3 (5-CCGTCTGAAACGCAGGGCTGCTACG-3) und GSP-5 (5-GCTGCGGCCAAGACAAGATCACAGC-3) amplifiziert. Als Positivkontrolle wurde die im *Kit* enthaltene Gesamt-RNA aus humaner Plazenta mitgeführt. Die Amplifikation erfolgte mit folgendem *touch down* PCR-Programm:

5 Zyklen: 94°C 10 s, 74°C 1 min

5 Zyklen: 94°C 10 s, 72°C 10 s, 72°C 1 min

32 Zyklen: 94°C 10 s, 70°C 10 s, 72°C 1 min

Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe des TOPO TA *Cloning<sup>®</sup> Kits* (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) in den Vektor pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup> subkloniert und in Bakterien transformiert. Positive Transformanten wurden durch den Verdau der isolierten Plasmide mit dem Enzym *NcoI* identifiziert. Ausgewählte Klone wurden zur Sequenzierung eingeschickt.

### 2.1.6 Herstellung von 5'-Deletionskonstrukten

Basierend auf dem isolierten DNA-Fragment sowie der Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes (TS), wurden 5'-Deletionskonstrukte zur Untersuchung des Promotorbereichs eingesetzt. Dabei wurde der *ang-2* Promotor vom 5'-Ende sukzessiv verkürzt. Die Promotorfragmente wurden mittels RT-PCR und dem Konstrukt *ang-2*(-2702) als Matritze amplifiziert. Der universelle 3'-Primer *ang-2*(+324) verfügte über eine *XhoI*-Schnittstelle; die Primer im 5'-nichttranskribierten Bereich waren dagegen mit einer *KpnI*- bzw. *HindIII*-Schnittstelle zur späteren Klonierung versehen (Tab. 2). Die amplifizierten PCR-Produkte wurden nach Restriktionsverdau mit den entsprechenden Endonukleasen in den Vektor pGL3-Basic subkloniert. Die Serie von 5'-Deletionskonstrukten war Grundlage für Transfektionsexperimente.



**Tab. 2: Primersequenzen für Deletionsanalyse**

Name	Sequenz (5'→3')
<i>ang-2</i> (+324) <sup>1</sup>	aatcaagcttcaatctgccacattcttctcag <sup>2</sup>
<i>ang-2</i> (-2702)	accgggtacctctctggtccgataatttcatt
<i>ang-2</i> (-1176)	actgctcgagaattgcacagatgaggacattaga
<i>ang-2</i> (-324)	actgctcgagacctcagatattttgccagcttag
<i>ang-2</i> (-100)	actgctcgagaagataacggctaagccaggag
<i>ang-2</i> (-41)	actgctcgagtcaacttatcatataaggaaaggaaag
<i>ang-2</i> (-6)	actgctcgagtcggatactgacactgttaggatct
<i>ang-2</i> (+10)	actgctcgaggtaggatctggggagagaggaac
<i>ang-2</i> (+27)	gctgctcgagagaggaacaaaggaccgtgaaa

### 2.1.7 Herstellung von Promotormutanten

Zur Untersuchung des *ang-2* Promotors in einem größeren genetischen Umfeld, wurden mittels *QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, USA) spezifische Mutationen in das Konstrukt *ang-2*(-2702/+324) eingeführt. Die genetischen Veränderungen wurden dabei über die Substitution von Nukleotiden eingebracht. Um dies zu erreichen, wurden komplementäre Primer synthetisiert, welche über die gewünschten Mutationen verfügten (Tab. 3). Das Ergebnis der gerichteten Mutagenese wurde durch Sequenzierung der entsprechenden Klone überprüft. Bei positivem Ergebnis konnten die generierten Plasmide in Transfektionen verwendet werden.

**Tab. 3: Primersequenzen für SDM<sup>3 4</sup>**

Name	Sequenz (5'→3')
GC-I forw	cggctaagccaggat <b>ttttt</b> gagcagcccactacac
GC-I rev	gccgattcggctc <b>taaaa</b> actcgtcgggtgatgtg
GC-II forw	gacactgtaggatc <b>ttttt</b> gagaggaacaaaggaccgtg
GC-II rev	ctgtgacatcctagaa <b>aaaaa</b> actcctctgtttcctggcac
EBS-1 forw	gctagtgacccctacac <b>cca</b> gataacggctaagcc
EBS-1 rev	ggcttagccgttatctt <b>ggt</b> gtagggggtcactagc
EBS-2 forw	caacttatcatataac <b>caaa</b> ccacagtgttgattcgg
EBS-2 rev	ccgaatcaatcact <b>gtggtt</b> ggttatatgataagttg

<sup>1</sup> Gemeinsamer Rückwärts-Primer für alle Deletionskonstrukte.

<sup>2</sup> Zur Klonierung benötigte Restriktionsschnittstellen sind in den Primersequenzen *kursiv* dargestellt.

<sup>3</sup> *Site-Directed Mutagenesis*

<sup>4</sup> Mutationen sind **fett** hervorgehoben.

Name	Sequenz (5'→3')
EBS-3 forw	ggatctggggagagagccaacaaccacgtgaaagc
EBS-3 rev	gctttcacggtgggttgggtctctccccagatcc

### 2.1.8 Subklonierung in ein heterologes Promotorsystem

Zur weiteren Untersuchung des proximalen Promotorbereichs von *ang-2* und zur näheren Charakterisierung wurden ausgewählte Elemente in ein *enhancer*freies heterologes Promotorsystem, den Vektor pT81-Luc subkloniert. Das Element *ang-2*(-105/+51) wurde dabei über RT-PCR mit spezifischen Primern mit dem Plasmid *ang-2*(-324/+324) als Matrize gewonnen, die weiteren Fragmente dagegen als einzelsträngige Oligonukleotide mit den notwendigen Schnittstellen für die Endonukleasen *XhoI* und *HindIII* zur Subklonierung synthetisiert (Tab. 4).

Tab. 4: Sequenzen zur Klonierung in den Reportergenvektor pT81.<sup>5</sup>

Name	Sequenz (5' → 3')
<i>ang-2</i> (-105/+51)	<i>tcgagacaggaagataacggctaagccaggagggcgagcagcccactacacatgtctggctgctttatca</i> <i>acttatcatataaggaaaggaaagtgattgattcgatactgacactgttaggatctgggagagaggaacaaa</i> <i>ggaccgtgaaagctgca</i>
<i>ang-2</i> (-105/-56)	<i>tcgagacaggaagataacggctaagccaggagggcgagcagcccactacacatga</i>
<i>ang-2</i> (-59/+8)	<i>tcgagcatgtctggctgcttctatcaacttatcatataaggaaaggaaagtgattgattcgatactgacaca</i>
<i>ang-2</i> (+5/+51)	<i>tcgagacactgttaggatctgggagagaggaacaaaggaccgtgaaagctgca</i>

### 2.1.9 Isolierung von RNA aus Zellen

Für die Isolierung von RNA wurde mit RNase-freiem Plastikmaterial, gestopften Spitzen sowie DEPC-behandeltem Wasser gearbeitet. Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis bzw. bei 4°C.

Nach Absaugen des Mediums aus den Zellkulturschalen, wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Je 10 cm Schale wurden 1 ml TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) auf die Zellen gegeben und für 5 min inkubiert. Die lysierten Zellen wurden in Eppendorfgefäße überführt und 200 µl Chloroform zugesetzt. Durch mehrmaliges Invertieren der Gefäße wurde eine homogene Lösung hergestellt, die nach 2 min zentrifugiert wurde (4°C, 10 min, 10 000 rpm). Die obere wässrige Phase mit der RNA wurde in ein neues Gefäß überführt und mit dem gleichen Volumen Isopropanol für 10 min bei RT präzipitiert. Das durch anschließende Zentrifugation gewonnene Pellet wurde nach Entfernen des Überstands mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und nach Abnahme des Überstands luftgetrocknet. Die RNA wurde in 50 µl DEPC-Wasser gelöst und bei -80°C gelagert. Zur Bestimmung

<sup>5</sup> Für die Subklonierung notwendige Schnittstellen sind *kursiv* dargestellt.

der Konzentration und Qualität der isolierten RNA wurde anschließend eine photometrische Analyse durchgeführt.

#### 2.1.10 Isolierung von RNA aus Zellen für cDNA-Microarray

Für den cDNA-Microarray war es notwendig qualitativ sehr hochwertige RNA bereitzustellen. Deshalb wurde für diese Versuche die RNA durch Kombination von TRIzol® (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) und dem RNeasy® Mini Kit von Qiagen GmbH (Hilden) isoliert. Nachdem die Zellen wie unter 2.1.9 beschrieben in Trizol aufgenommen, mit Chloroform gemischt und die RNA nach Zentrifugation in der wässrigen Phase angereichert war, setzte das veränderte Protokoll ein. Die wässrige Phase mit der gelösten RNA wurde mit dem gleichen Volumen eiskaltem 70% Ethanol gemischt und die Suspension auf die Isolationssäule überführt. Die weitere RNA-Isolierung erfolgte nach Herstellerangaben, wobei der optionale Arbeitsschritt der DNase-Behandlung (RNeasy-Free DNase Set, Qiagen GmbH, Hilden) ebenfalls durchgeführt wurde. Die Quantität der RNA wurde photometrisch mittels NanoDrop® UV/Vis-Spektralphotometer (PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) und die Qualität mit Hilfe des Bioanalyzer sowie dem RNA Nano LabChip® (Agilent Technologies, Böblingen) bestimmt.

#### 2.1.11 RT-PCR (Reverse Transkription)

Durch das Enzym Reverse Transkriptase wird RNA bei Anwesenheit geeigneter Primer in cDNA umgeschrieben, die daher zum spezifischen Nachweis geringer RNA-Mengen verwendet werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurden 1 µg Gesamt-RNA je Ansatz in einem Gesamtvolumen von 8 µl mit DEPC-Wasser verwendet. Nach Zugabe von je 1 µl 10 mM dNTP und 1 µl Oligo-dT (500 ng) wurden die Ansätze für 5 min bei 65°C inkubiert. Durch Abkühlung der Proben auf Eis lagerten sich die Oligonukleotide an die RNA an. Anschließend wurden je Ansatz 2 µl RT-Puffer, 4 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 2 µl DTT (0,1 M) sowie 1 µl RNaseOut zugesetzt (*SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR*, Invitrogen GmbH, Karlsruhe). Die Ansätze wurden nach dem Mischen für 2 min bei 42°C äquilibriert bevor je 1 µl *SuperScript™ II Reverse Transcriptase* (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) zugegeben wurde. Die reverse Transkription in cDNA erfolgte bei 42°C für 50 min und wurde durch anschließende Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 70°C für 15 min beendet. Nach Abkühlen der cDNA auf Raumtemperatur wurde der Ansatz mit 30 µl ddH<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 50 µl aufgefüllt. Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

#### 2.1.12 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist eine effiziente Methode zur spezifischen Amplifikation von DNA-Sequenzen aus einem DNA-Gemisch. Dazu ist es notwendig, die Sequenz zu kennen und entsprechende Oligonukleotid-Primer zu synthetisieren.

Eine PCR läuft prinzipiell immer nach dem gleichen Schema ab, das aus einem Denaturierungs-, einem Annealing- und einem Elongationsschritt besteht: Die DNA wird bei einer Temperatur von 94°C denaturiert, dabei trennen sich die beiden Stränge. Zum Annealing wird die Temperatur stark gesenkt,

um die Hybridisierung der Primer an ihre Zielsequenzen zu ermöglichen. Der letzte Schritt läuft bei 72°C, der optimalen Temperatur für die *Taq*-Polymerase. Die Primer werden verlängert und es entstehen doppelsträngige DNA-Fragmente. Dieser Zyklus wird wiederholt, wodurch es zu einer Anreicherung der gewünschten Sequenz kommt. Durch die finale Elongation bei 72°C für 10 min wird die PCR abgeschlossen.

#### 2.1.12.1 Semiquantitative RT-PCR

Die RT-PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 25 µl durchgeführt. Der Ansatz setzte sich aus 10x PCR-Reaktionspuffer, 1 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen GmbH, Karlsruhe), 0,4 mM dNTP-Mix, je 0,4 µM der Vorwärts- als auch Rückwärts-Primer sowie 0,125 µl der *Taq*-DNA-Polymerase (5 U/µl, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) zusammen. Als Template wurden Plasmid-DNA oder cDNA eingesetzt. Die PCR wurde standardmäßig nach folgendem Programm im *RoboCycler*<sup>®</sup> Gradient 96 (Stratagene, USA) durchgeführt: Nach der initialen Denaturierung bei 94°C für 5 min folgten 30-40 Amplifikationszyklen mit Denaturierung (30 s bei 94°C), Primerannealing (30-50 s bei 54-56°C) sowie Elongation (45 s bei 72°C). Für die abschließende Elongation wurden die Ansätze bei 94°C für 10 min inkubiert. Um eine semiquantitative Aussage zur Expression treffen zu können, wurde das Gen *β-aktin*, welches konstitutiv exprimiert wird, parallel amplifiziert. Durch anschließende Agarosegelelektrophorese wurden je 5 µl der PCR-Produkte visualisiert und die optische Dichte der Bande des Testgens in Relation zur optischen Dichte der Bande von *β-aktin* aus derselben RT-Reaktion dargestellt.

Um Kontaminationen der Reagenzien zu erkennen, wurden zusätzlich zu jedem Ansatz eine *non-template*-Kontrolle (NTC, *non template control*), die Wasser statt cDNA enthielt, bei jedem Versuchsdurchlauf mitgeführt.

**Tab. 5: Primersequenzen für semiquantitative RT-PCR**

Name	Sequenz (5' → 3')	Größe
<i>ang-2</i> forw	ggatctggggagagaggaac	535 bp
<i>ang-2</i> rev	ctctgcaccgagtcacgta	
<i>ang-1</i> forw	agaaccacacggctaccatgct	409 bp
<i>ang-1</i> rev	tgtgtccatcagctccagttgc	
<i>tie-1</i> forw	gccatgatcaagaaggacgg	404 bp
<i>tie-1</i> rev	gttctctccgaccagcacat	
<i>tie-2</i> forw	ccttaatgaaccagcaccagg	459 bp
<i>tie-2</i> rev	ccttaatgaaccagcaccagg	
<i>β-aktin</i> forw	accaactgggacgacatggag	775 bp
<i>β-aktin</i> rev	cgctcaggaggagcaatgatc	

### 2.1.12.2 Real-Time RT-PCR

Die *Real-Time* RT-PCR ist eine Weiterentwicklung der konventionellen PCR, durch die eine Quantifizierung von Nukleinsäuren möglich wird. Diese kann unter Verwendung einer spezifischen Sonde neben den Primern erfolgen oder unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes *SYBR-Green*. Grundlegend für die Sonden-basierte Methode ist die Ausnutzung der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der *Taq*-Polymerase in Verbindung mit einer fluoreszenz-markierten Sonde. Dieses sequenzspezifische dritte Oligonukleotid hybridisiert an die Matrize zwischen den beiden Primern. Die Sonde ist am 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporter- und am 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff markiert. Zusätzlich ist das 3'-Ende mit einem Phosphatrest blockiert, um eine Verlängerung der Sonde während der Elongationsphase zu verhindern. Regt man die intakte Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge ( $\lambda=488\text{ nm}$ ) an, wird die Reporter-Fluoreszenz aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher durch Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) auf diesen übertragen. Nur die Emission des Quenchers wird dadurch messbar. Sowohl Primer als auch die Sonde lagern sich während des Hybridisierungsschritts an die Matrize an (Abb. 8A). Die Sonde weist gegenüber den Primern eine erhöhte Schmelztemperatur auf, wodurch sie während der Elongation durch die *Taq*-Polymerase verdrängt wird. Dabei bildet die Sonde eine Y-förmige Sekundärstruktur, bei der das 5'-Ende der Sonde verdrängt wird, das 3'-Ende jedoch noch mit der Matrize hybridisiert ist (Abb. 8B). Durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase wird die Sonde vollständig hydrolysiert. Reporter und Quencher verlieren ihre räumliche Nähe zueinander, wodurch FRET aufgehoben wird und die Farbstoffe in zwei unterschiedlichen Wellenlängen fluoreszieren. Das Signal des Reporters kann somit detektiert werden (Abb. 8C). Mit der Anreicherung des PCR-Produktes steigt auch die freigesetzte Fluoreszenz an. Durch die Verwendung von Primern und Sonde ist die *TaqMan*-Methode hochspezifisch und kann zur quantitativen Bestimmung herangezogen werden.

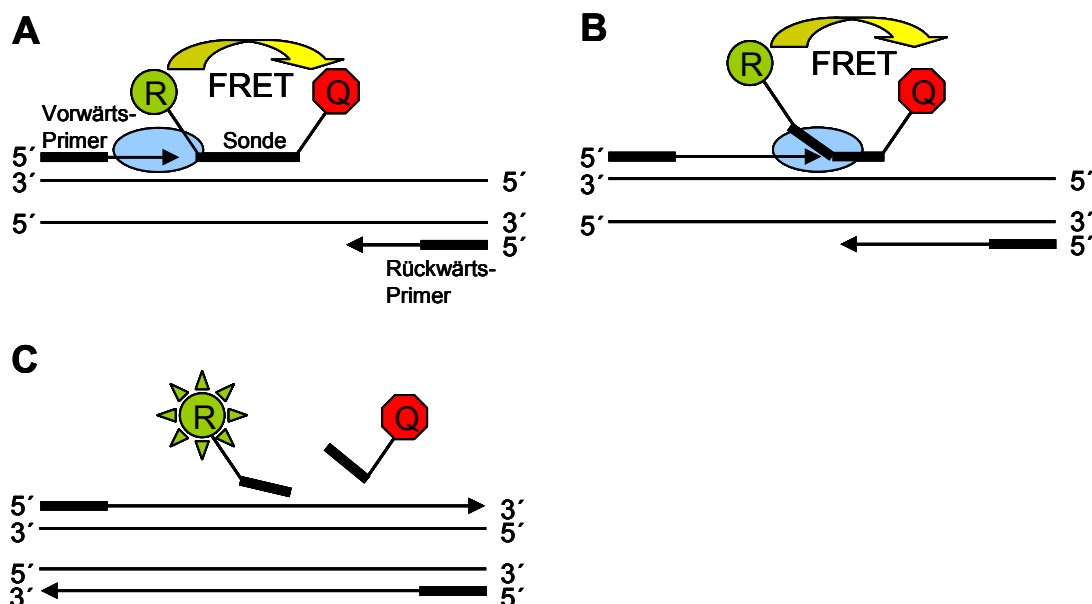


Abb. 8: Prinzip der *TaqMan*<sup>TM</sup>-PCR.

A) Zum Beginn der Elongation ist die Sonde intakt und mit der cDNA hybridisiert. Es findet ein Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) statt. B) Durch die Verdrängung kommt es zur Ausbildung einer Y-förmigen Sekundärstruktur der Sonde mit anschließender Hydrolyse. C) Vollständige Hydrolyse der Sonde nach Beendigung der Elongation. Es findet kein FRET mehr statt und das Fluoreszenz-Signal des Reporters wird messbar. R - Reporter, Q - Quencher, *Taq*-Polymerase ist blau dargestellt.

Im *SYBR-Green Assay* wird auf eine spezifische Sonde verzichtet. Der Farbstoff *SYBR-Green* interkaliert mit doppelsträngiger DNA während der Elongationsphase. Durch Anregung mit UV-Licht sendet der fluoreszierende Farbstoff Lichtquanten aus, die gemessen werden. Nachteil der *Real-Time RT-PCR* mit *SYBR-Green* ist die Detektion jeglicher doppelsträngiger DNA im PCR-Ansatz, eingeschlossen sind unspezifische Produkte und Primer-Dimere. Zur Unterscheidung von spezifischen und unspezifischen PCR-Produkten kann im Anschluss an die Amplifikation eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt werden, bei der die Ansätze kontinuierlich bis 95°C erhitzt und die Fluoreszenzänderungen gemessen werden. Anhand der Daten lässt sich die PCR auf unspezifische Produktbildung untersuchen.

Um Kontaminationen zu vermeiden wurde mit gestopften Spitzen sowie RNase-freiem Plastikmaterial (Applied Biosystems, USA) und DEPC-Wasser gearbeitet. In der vorliegenden Arbeit wurde das qPCR™ *Core kit* (Eurogentec, Belgien) verwendet. Pro PCR-Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 25 µl wurden je 0,75 µl der Vorwärts- und Rückwärts-Primer (10 pmol/µl), 0,125 µl Sonde (20 pmol/µl) (metabion GmbH, Martinsried), 2,5 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1 µl dNTP (5 mM) sowie 0,125 µl der HotGoldStar *Taq* (5U/µl) eingesetzt. Als DNA-Matrize dienten je 2 µl cDNA. Die Amplifikation und Detektion des Fluoreszenzsignals erfolgte mittels des Mx3000p der Firma Stratagene (10 min 95°C, 40 Zyklen 15 s 95°C und 30 s 60°C). Als endogener Standard wurde das *housekeeping* Gen *β-aktin* amplifiziert.

Die Gene *ephrinB2*, *notch4*, *jag2* und *amot* wurden mittels des qPCR™ *SYBR-Green Kits* von Eurogentec untersucht. Pro PCR-Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 25 µl wurden je 0,75 µl der Vorwärts- und Rückwärts-Primer (10 pmol/µl), 2,5 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1 µl dNTP (5 mM), 0,125 µl der HotGoldStar *Taq* (5U/µl) sowie 0,75 µl *SYBR Green* eingesetzt. Als DNA-Matrize dienten je 2 µl cDNA. Die Amplifikation und Detektion des Fluoreszenzsignals erfolgte mittels des Mx3000p der Firma Stratagene (10 min 95°C, 40 Zyklen 15 s 95°C und 30 s 60°C). Im Anschluss an die Amplifikation wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Als endogener Standard wurde das *housekeeping* Gen *β-aktin* amplifiziert.

Um Kontaminationen der Reagenzien zu erkennen, wurden zusätzlich zu jedem Ansatz eine *non-template*-Kontrolle (NTC, *non template control*), die Wasser statt cDNA enthielt, bei jedem Versuchsdurchlauf mitgeführt.

**Tab. 6: Primersequenzen für *Real-Time* RT-PCR**

Name	Sequenz (5' → 3')	Größe
<i>ang-2</i> forw	ctacacgttaacattccctaattctacag	100 bp
<i>ang-2</i> rev	atcctcacgtcgctgaataattg	
<i>ephrinB2</i> forw	cggtcgtgagaattgactga	245 bp
<i>ephrinB2</i> rev	ctgtcttcccttggtcttg	
<i>notch4</i> forw	cacgtgaacccatgtgagtc	190 bp
<i>notch4</i> rev	cacagtggaatcctccaggt	

Name	Sequenz (5' → 3')	Größe
<i>jag2</i> forw	cgctgtatgaaaggagagagcaa	110 bp
<i>jag2</i> rev	ccgagtgaggaataaaaggaagatt	
<i>amot</i> forw	gtttgacctgcaatccagacaa	85 bp
<i>amot</i> rev	cccaggatctgaatgggagtt	
$\beta$ - <i>aktin</i> forw	tgcattgttacaggaagtcctt	78 bp
$\beta$ - <i>aktin</i> rev	gggagaggactgggccat	

Tab. 7: Sondensequenzen für *Real-Time* RT-PCR

Name	Sequenz (5'-FAM → 3'-TAMRA <sup>6</sup> )
<i>ang-2</i> Sonde	catggaagctggaggaggcggg
$\beta$ - <i>aktin</i> Sonde	ccatcctaaaagccacccactctctcta

Zur Quantifizierung kam die vergleichende  $C_T$ -Methode ( $\Delta\Delta C_T$ -Methode) zum Einsatz [102]. Dabei wird der Zyklus der Reaktion gemessen, bei dem die Amplifikation des Produkts zuerst detektiert wird. Der gemessene  $C_T$ -Wert (*threshold cycle*) entspricht dem Zyklus bei dem die Fluoreszenz einen Schwellenwert (*threshold*) oberhalb der Basislinie überschreitet. Je stärker ein Gen in Geweben oder Zellen exprimiert wird, desto kleiner ist der  $C_T$ -Wert. Vergleicht man die  $C_T$ -Werte verschiedener Proben untereinander so ist eine relative Quantifizierung der Expressionsstärke möglich. Neben dem zu untersuchenden Gen wurden für die Quantifizierung auch die  $C_T$ -Werte von  $\beta$ -*aktin* als endogener Standard bestimmt.

### 2.1.13 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

#### 2.1.13.1 Identifikation DNA-bindender Proteine mittels EMSA

Eine Technik zur Untersuchung von DNA-Protein-Interaktionen sind EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*)-Studien. Sie basieren auf der Tatsache, dass DNA-Protein-Komplexe langsamer im nativen Polyacrylamid-TBE-Gel migrieren als freie DNA-Moleküle, wenn sie durch Elektrophorese aufgetrennt werden. Die Bindung eines Proteins an die DNA führt gegenüber der freien DNA aufgrund des höheren Molekulargewichts zu einer Veränderung der Laufeigenschaften im elektrischen Feld, d.h. zu einem *Shift*. Dieser ist an einer Verschiebung der radioaktiv markierten DNA-Bande zu erkennen. Wird zusätzlich noch ein spezifischer Antikörper gegen das DNA-bindende Protein zugegeben, tritt eine weitere Verschiebung der Bande aufgrund des zunehmenden Molekulargewichts auf, ein *Supershift*. Mit dieser Methode können sequenzspezifische DNA-bindende Proteine, z.B. Transkriptionsfaktoren, in Verdrängungs- und *Supershift*-Untersuchungen identifiziert werden. In

<sup>6</sup> FAM (6-Carboxy-Fluoreszein) bezeichnet den Reporter-Farbstoff; TAMRA (6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin) den des Quenchers.

Verbindung mit gerichteter Mutagenese können darüber hinaus wichtige Bindungssequenzen innerhalb von stromaufwärts gelegenen regulatorischen Regionen von Genen bestimmt werden.

### 2.1.13.2 Präparation von Kernextrakten

Zur Präparation von nukleären Extrakten aus der Zelllinie HMEC-I wurden  $10^6$  Zellen je 10 cm Schale ausgesät. Nach 24 Stunden Kultivierung in serumhaltigem MCDB-13-Medium wurden die Zellen für weitere 24 Stunden in serumfreiem *UltraCulture* (BioWhittaker<sup>TM</sup>, Cambrex USA) kultiviert. Nach Waschen der adhärennten Zellen mit eiskaltem PBS, wurden je Schale 300 µl Puffer A auf den Zellrasen gegeben und die gründlich im Puffer abgeschabten Zellen in Reaktionsgefäße überführt. Nach Zugabe von 0,125% (v/v) Nonidet P-40 folgte eine kurze Inkubation auf Eis zur Dissemblierung der Zellmembran. Durch einen Zentrifugationsschritt von 10 min bei 4°C und 1000 g konnten das Zytoplasma und die Zellkernfraktion voneinander getrennt werden. Das Pellet mit den nukleären Proteinen wurde in 40 µl Puffer C resuspendiert und durch eine Zentrifugation von 10 min bei 4°C und 12 000 g von restlichen Zellbestandteilen und Kernmembranresten befreit. Der Proteingehalt wurde nach der Bradford-Methode mittels Roti-Quant (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) bestimmt. Die Kernextrakte wurden bei -80°C aufbewahrt.

**Tab. 8: Zusammensetzung der Puffer zur Präparation von Kernextrakten**

Vor dem Versuch wurde beiden Puffern 0,5 mM DTT und 0,5 mM PMSF zugesetzt.

	Puffer A	Puffer C
Tris, pH 7,9	10 mM	20 mM
KCl	10 mM	-
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	1,5 mM
NaCl	-	0,42 M
Glycerol	10 % [v/v]	10 % [v/v]
EDTA	-	0,2 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM	10 mM
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	1 mM	1 mM
NaF	10 mM	10 mM

### 2.1.13.3 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Für den EMSA war es notwendig die synthetisierten Einzelstrang-Oligonukleotide (Tab. 9) zu hybridisieren, da nur Doppelsträngige an nukleäre Proteine binden können. Um dies zu erreichen wurden 5 µg komplementäre Oligonukleotide (Tab. 9) mit ddH<sub>2</sub>O auf 50 µl aufgefüllt und 5 min bei 95°C inkubiert. Während des folgenden langsamen Abkühlens auf RT erfolgte die Hybridisierung. Überprüft wurde dieser Vorgang, indem ein Teil der Probe auf TBE-Gel aufgetragen und das Laufverhalten im elektrischen Feld im Vergleich zu einzelsträngigen DNA-Fragmenten analysiert wurde. Doppelsträngige DNA wandert aufgrund des höheren Molekulargewichts langsamer im Feld.



Die Hybridisierung der Oligonukleotiden zur Subklonierung ins heterologe Promotorsystem (Tab. 4) erfolgte nach dem gleichen Verfahren.

**Tab. 9: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide im EMSA<sup>7 8</sup>**

Name	Sequenz (5' → 3')
<i>ang-2</i> (-105/+51) <sup>9</sup>	acaggaagataacggctaagccaggagggcggagcagcccactacacatgtctggctgctcttatcaacttat catataaggaaaggaaagtgattgattcgatactgacactgtaggatctgggagagaggaacaaaggacc gtgaaagctgc
<i>ang-2</i> (-105/-56)	acaggaagataacggctaagccaggagggcggagcagcccactacacatg
<i>ang-2</i> (-59/+8)	catgtctggctgctcttatcaacttatcatataaggaaaggaaagtgattgattcgatactgacac
<i>ang-2</i> (+5/+51)	acactgtaggatctgggagagaggaacaaaggaccgtgaaagctgc
<i>ang-2</i> (-86/-64)	gccaggagggcggagcagcccac
<i>ang-2</i> (-86/-64)M	gccaggat <b>ttttt</b> gagcagcccac
<i>ang-2</i> (+10/+29)	gtaggatctgggagagagg
<i>ang-2</i> (+10/+29)M	gtaggatct <b>ttttt</b> gagagg
Sp1 cons	attcgatcggggcggggcgagc
Sp1 mut	attcgatcgg <b>ttc</b> ggggcgagc
AP-2 $\alpha$ cons	gatcgaactgaccgcccgcggcccgt
AP-2 $\alpha$ mut	gatcgaactgaccg <b>ctt</b> gcggcccgt
Ets cons (PU.1)	gggctgcttgaggaagtataagaat
Ets mut (PU.1)	gggctgcttgag <b>ag</b> agtataagaat
Ets cons (Ets-1))	gatctcgagcaggaagttcga
Ets mut (Ets-1)	gatctcgagca <b>aga</b> agttcga
Egr cons	ggatccagcggggcgagcggggcgga
Egr mut	ggatccagc <b>tag</b> ggcgagc <b>tag</b> ggcgga

#### 2.1.13.4 Radioaktive Oligonukleotidmarkierung

Die radioaktive Markierung der in EMSA-Studien eingesetzten doppelsträngigen Oligonukleotide wurde durch enzymatischen Austausch der 5'-Phosphatgruppe durch radioaktives [ $\gamma^{32}$ P]-ATP (GE Healthcare, München) unter Verwendung der T4-Polynucleotid Kinase (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) erzielt. 150 ng des jeweiligen Oligonukleotids wurden in einem Ansatz von 25  $\mu$ l Gesamtvolumen mittels 5  $\mu$ l [ $\gamma^{32}$ P]-ATP (250  $\mu$ Ci/25  $\mu$ l), 0,5  $\mu$ l T4-Kinase sowie T4-Kinase-Puffer markiert. Dazu wurde der Reaktionsansatz für 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Reinigung der DNA

<sup>7</sup> Mutationen sind **fett** hervorgehoben.

<sup>8</sup> Sämtliche Sequenzen, die mit cons oder mut gekennzeichnet sind, entstammen den bei Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA, USA) erhältlichen Oligonukleotiden.

<sup>9</sup> Wurde über PCR mit dem Plasmid *ang-2*(-324/+324) als Matrize gewonnen.

mittels *Nucleotide Removal Kit*<sup>®</sup> (Qiagen GmbH, Hilden) nach Herstellerangaben. Die markierte Sonde wurde mit 100 µl ddH<sub>2</sub>O eluiert.

#### 2.1.13.5 EMSA

Für die Bindungsreaktion zwischen Kernproteinen und radioaktiv markierter Sonde wurden 6 µg Proteinextrakt und Oligonukleotide in *Shift*-Puffer (20 mM HEPES pH 8,4; 60 mM KCl; 10% (v/v) Glycerol; 1 mM ZnCl<sub>2</sub>) in Gegenwart von 15 µg BSA, 5 mM DTT und 1 µg Poly(dI-dC) als unspezifischer Kompetitor in einem Gesamtvolumen von 30 µl für 30 min auf Eis inkubiert. Für Verdrängungsstudien wurden die Oligonukleotide (Tab. 9) in 100fachem molarem Überschuss eingesetzt. Bei *Supershift* Studien wurden statt der Verdrängungsoligonukleotide 1 µl des Antikörpers (Tab. 10) zugegeben und ebenfalls für 30 min auf Eis inkubiert. Nachdem die radioaktiv markierte Sonde zugegeben und der Ansatz für 30 min bei 37°C inkubiert wurde, konnte das Polyacrylamid-Gel beladen werden. Dazu wurden 0,5% (w/v) native 0,5x TBE-Polyacrylamid-Gele (5% Acrylamid/ Bisacrylamid, TBE, APS, TEMED) verwendet, die nach dem Vorlauf von 45 min bei 100 V beladen wurden. Zur Auftrennung der Proben wurde die Elektrophorese für ca. 2 Stunden bei 200 V fortgesetzt. Anschließend wurde das Gel bei 80°C unter Vakuum getrocknet und mittels einer Verstärkerfolie (Kodak BioMax *Intensifying Screen*<sup>®</sup>, Amersham Bioscience, Freiburg) bei -80°C auf Kodak BioMax MR *Films*<sup>®</sup> (Amersham Bioscience, Freiburg) für 8 bis 24 Stunden exponiert.

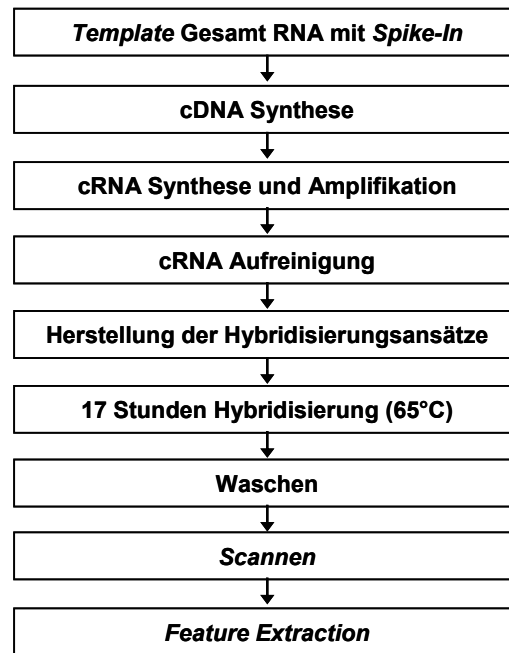
**Tab. 10: Antikörper für *Supershift*-Studien**

Name	Quelle
AP-2α (C-18)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Egr-1 (C-19)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
GATA4 (C-20)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Sp1 (PEP 2)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Sp3 (D-20)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

#### 2.1.14 DNA-Microarray

Zellen der endothelialen Zelllinie EA.hy926 sowie primäre humane umbilikale venöse Endothelzellen HUVEC wurden in Zellkulturschalen ausgesät und über 72 Stunden mit dem DNMT Inhibitor 5-Aza-2'-Deoxycytidine (5-Aza-dC) inkubiert. Die RNA-Extraktion erfolgte wie unter 2.1.10 beschrieben.

Zur Genexpressionsanalyse wurden *4x44k Human Whole Genome Oligo Microarrays* der Firma Agilent Technologies (Agilent Technologies, Böblingen) verwendet. Das in Abb. 9 dargestellte Fließschema gibt den Verlauf der *Microarray*-Analyse wieder.



**Abb. 9:** Fließschema des *Microarrays* (Agilent Technologies, Böblingen).

Zunächst wurden 2 µg der Kontrollen mit RNA *Spike-In* A als interner Standard nach Herstellerangaben des *Two-Color RNA-spike-In Kit* (Agilent Technologies, Böblingen) versetzt. Die *Spike-In* RNA wurde in einer Verdünnung von 1:3.200 verwendet. Die anschließende cDNA-Synthese erfolgte unter Verwendung des *Low RNA Input Fluor Linear Amplification Kits* (Agilent Technologies, Böblingen). Die synthetisierte cDNA wurde im nächsten Schritt in cRNA unter gleichzeitiger Markierung mit fluoreszierenden Farbstoffen umgeschrieben. Die Kontrollen wurden mit dem grünen Farbstoff Cyanine 3-CTP (Cy3) und die Proben mit dem rot fluoreszierenden Farbstoff Cyanine 5-CTP (Cy5, beide PerkinElmer, USA) markiert. Mittels RNeasy-Säulchen des *RNeasy Mini Kits* (Qiagen GmbH, Hilden) erfolgte eine Aufreinigung der markierte cRNA. Um den Versuch fortsetzen zu können, waren sowohl eine Quantifizierung der cRNA-Synthese als auch eine Bestimmung der spezifischen Aktivität, der Einbaurate der Farbstoffe Cy3 und Cy5, erforderlich. Diese Parameter wurden photometrisch mit dem NanoDrop® UV/Vis-Spektralphotometer (PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) bestimmt. Das Protokoll wurde erfolgreich durchgeführt, wenn die cRNA Ausbeute über 825 ng lag und die spezifische Aktivität der fluoreszierenden Farbstoffe den Wert 8,0 pmol Cyanine / µg cRNA überstieg. Der sich anschließenden Hybridisierung war eine Fragmentierung der Ansätze vorangestellt. Hierzu wurde je 825 ng der Cy3-markierten Kontroll-cRNA mit 825 ng der Cy5-markierten Proben-cRNA gemischt und unter Zugabe von 10x *Blocking Agent* sowie 25x *Fragmentation Buffer* nach Herstellerangaben für 30 min bei 60°C lichtgeschützt inkubiert. Der Inkubation schloss sich die Hybridisierung der fragmentierten cRNA-Ansätze auf den *Microarrays* direkt an. Diese erfolgte bei 65°C über 17 Stunden. Nach dem Waschen und Lufttrocknen der *Microarray-Slides* wurden diese mit Hilfe des *DNA Microarray Dual Laser Scanners* der Firma Agilent Technologies ausgelesen.

Die Auswertung der Expressionsanalyse wurde mit dem Programm *GeneSpring* Version 4.2 (Silicon Genetics) nach Import der *Microarray*-Daten durchgeführt. Um zwischen tatsächlichen Genexpressionsunterschieden und messtechnischen Schwankungen zu differenzieren, wurden die *Microarray*-Daten vor der Analyse normalisiert. Messwerte, die <0,01 waren wurden auf 0,01 gesetzt. Anschließend erfolgte die Normalisierung der Daten nach verschiedenen Algorithmen:

- *per-spot* Normalisierung:

$$\text{Normalisiertes Signal} = \frac{\text{Rohsignal von Transkript X}}{\text{Wert des Kontrollkanals für Transkript X}}$$

- *per-chip* Normalisierung:

$$\text{Normalisiertes Signal} = \frac{\text{Rohsignal von Transkript X}}{\text{Median der Rohsignale aller Transkripte}}$$

- *per-gene* Normalisierung:

$$\text{Normalisiertes Signal} = \frac{\text{Rohsignal von Transkript X aus Probe A}}{\text{Median aller Rohsignale von Transkript X im Versuch}}$$

Die Expression von Genen mit einer *Fold Change* (FC) von  $\geq 2$  wurden als induziert gewertet, eine *Fold Change* von  $\leq 0,5$  dagegen zeigte eine erniedrigte Genexpression an.

### 2.1.15 *In silico* Analysen des *ang-2* Gens

Mit Hilfe der Analyse bekannter DNA und RNA Sequenzen *in silico* kann ein allgemeiner Überblick über das zu untersuchende Gen und dessen Transkripte erlangt werden. Ein Abgleich der isolierten genomischen *ang-2* DNA erfolgte über die NCBI-Datenbank (*National Center for Biotechnology Information*). Referenz: *Homo sapiens angiopoietin-2 (AGPT2) gene, promoter region, 5' UTR and partial cds*. AY563557, gi:50082537.

Die Identifizierung von potentiellen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren im *ang-2* Promotor erfolgte mit zwei Programmen: *AliBaba2.1* (<http://www.gene-regulation.com/index.html>) und *MatInspector* Software (Genomatix Software GmbH, München).

Zur genauen Bestimmung CpG-reicher Regionen und zur Vorhersage von CpG-Inseln wurde das Programm CpGPlot (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/cpgplot/index.html>) aus der Programmsammlung EMBOS (European Molecular Biology Open Software Suite) verwendet. Die Analyse der CpG-Inseln erfolgte nach den von Gardiner-Garden und Frommer vorgeschlagenen Kriterien [82].

## 2.2 Immunzytologie

Die Zellen zur immunzytologischen Färbung wurden in Medium auf autoklavierte runde Deckgläser (Menzel, Braunschweig) ausgesät. Zur Fixierung wurden die adhärenenten Zellen auf den Deckgläsern mit PBS gewaschen und anschließend mit frisch angesetztem Methanol/-Aceton-Gemisch (1:1) für 2 min fixiert. Nach erneutem Waschen der Zellen mit PBS wurden sie in PBS mit 0,1% TritonX-100 für 10 min permeabilisiert. Die auf diese Weise fixierten Zellen konnten kurzfristig in PBS bei 4°C bis zur Färbung gelagert werden.

Vor der Färbung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend unspezifische Bindungen mit 5% Pferdeserum für 30 min bei RT blockiert. Der Primärantikörper gegen Ang-2 (Ang-2 SC-7015, Ziege polyklonal, Santa Cruz Biotechnologies, CA, USA) wurde 1:500 in PBS mit 0,1% Pferdeserum eingesetzt und bei 4°C über Nacht in einer feuchten Kammer auf den Zellen inkubiert. Im Anschluss wurden die Deckgläser 3 x mit PBS gewaschen und mit dem fluoreszenzmarkierten Antikörper 1:500 (*Donkey anti-goat IgG*, Cy3; Chemicon International) für 60 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, 20 µg/ml) zur Visualisierung der Zellkerne für 1 min gegengefärbt und mit MOWIOL eingebettet. Bis zur Dokumentation wurden die gefärbten Zellen im Dunkeln bei 4°C gelagert. Um Eigenfluoreszenz der Zellen bzw. Kreuzreaktionen der Antikörper auszuschließen, wurden ausschließlich mit dem Sekundärantikörper behandelte Kontrollen verwendet. Die Auswertung der indirekten Fluoreszenz wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop (Leica-Mikroskop DMLB, Leica Microsystems, Wetzlar), welches mit einem Leica-Objektiv (PL Fluotar 40x/0.70 PH2) und der Leica-Kamera (DFC 490) ausgestattet war, durchgeführt. Die Aufnahmen wurden unter Zuhilfenahme der Software *Leica Application Suite* Version 2.8.1 angefertigt und mit dem Programm *Adobe Photoshop CS2* Version 9.0 digital bearbeitet.

## 2.3 Allgemeine Methoden der Zellkultur

### 2.3.1 Kultivierung von Zellen

Die endothelialen Zelllinien EA.hy926 und HMEC-I sowie die Magenkarzinomzelllinie AGS wurden unter Standardbedingungen bei 37°C und einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5% im Gasschrank (Heraeus, Berlin) kultiviert. EA.hy926 und AGS Zellen wurden in DMEM (Gibco) mit 10% fötalem Kälberserum (FKS, Biochrom AG, Berlin) unter Zugabe von 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom AG, Berlin) in Kultur gehalten. Dagegen bestand das Kulturmedium für HMEC-I Zellen aus MCDB-131 (Gibco) mit 15% FKS, EGF (*Epidermal growth factor*, 100 µg/ml), Hydrocortison (1 mg/ml), L-Glutamin (Gibco) und 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin.

Die Kultivierung von *Drosophila melanogaster* SL-2 Zellen erfolgte in Schneider's *Drosophila* Medium (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) mit 10% FKS für Insektenzellen (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim) unter Zugabe von 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bei 25°C und atmosphärischem CO<sub>2</sub>.

Zellen wurden zur Aufbewahrung in 10% DMSO/Kulturmedium eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert. Das Auftauen erfolgte zügig im Wasserbad bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen in Kulturmedium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt. Nach 24 Stunden erfolgte der erste Mediumwechsel.

Die Primärzellen HUVEC (*human dermal microvascular endothelial cells*) wurden als *low-serum* Kultur bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gehalten. Die notwendigen Medien und Supplemente (*endothelial cell growth medium*; ECGS/H 0,4%; FKS 2%, EGF 0,1 ng/ml; Hydrocortison 1 µg/ml; *basic fibroblast growth factor* 1 ng/ml) wurden wie die HUVEC Zellen über PromoCell GmbH (Heidelberg) bezogen. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 70 bis 90% passagiert. Wegen des geringen FKS Anteils im Medium wurde das *DetachKit* von PromoCell GmbH (Heidelberg) mit einer *Trypsin Neutralizing Solution* zur Subkultivierung genutzt. Der Mediumwechsel erfolgte jeden zweiten Tag. Für Versuche wurde mit den Passagen 5 bis 8 gearbeitet.

Tab. 11: Zelllinien

Name	Beschreibung
EA.hy926	Hybridomzelllinie aus HUVEC und humaner Lungenepithelzelllinie A549, endothelial
HMEC-I	Immortalisierte Zelllinie Ursprung: Primärkultur aus HMEC ( <i>human dermal microvascular endothelial cells</i> ), endothelial
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i> , endotheliale Primärzellen aus der Nabelschnur
AGS	humanes Magenadenokarzinom, epithelial
Schneider SL-2	<i>Drosophila melanogaster</i> Zelllinie

### 2.3.2 Transiente Transfektion mit Effectene®

Durch transiente Transfektionen ist es möglich DNA in Zellen einzuschleusen, die dort jedoch nur eine begrenzte Lebensdauer von wenigen Tagen hat.

Sowohl die endothelialen Zelllinien EA.hy926 und HMEC-I als auch die Schneider SL-2 Zellen wurden mittels Effectene® (Qiagen GmbH, Hilden), einer auf Lipid-DNA-Komplex-Bildung basierten Methode, transfiziert (Tab. 12). Hierfür wurde am Vortag der Transfektion eine definierte Anzahl von Zellen in *wells* von 24-*well*-Platten ausgesät, so dass sie am Tag des Versuchs eine Konfluenz von 70 bis 90% aufzeigten. Bei Transfektion unterschiedlicher Mengen an Reporterplasmid wurde mit dem entsprechenden Leervektor aufgefüllt, um gleiche Bedingungen zu schaffen. Um die Transfektionseffizienz überprüfen zu können, wurden die Zellen parallel mit 30 ng des Plasmids pRL-TK je *well* kotransfiziert, welches zur Expression des Luziferasegens des Leuchtkäfers *Renilla reniformis* führte. Dies war bei den SL-2 Zellen jedoch nicht möglich, da das Gen in diesen Zellen einer Regulation unterlag und somit nicht zur Auswertung herangezogen werden konnte. In diesem Fall wurden die absoluten Werte zur Auswertung genutzt.

Tab. 12: Transfektionsprotokolle

Zelllinie	Zellzahl	Enhancer [µl/1 µg DNA]	Effectene [µl/1 µg DNA]	DNA [ng]	Transfektions- dauer [h]
EA.hy926	75 000	13,3	10	400	6
HMEC-I	50 000	13,3	10	400	12
SL-2	100 000	8	5	750	6

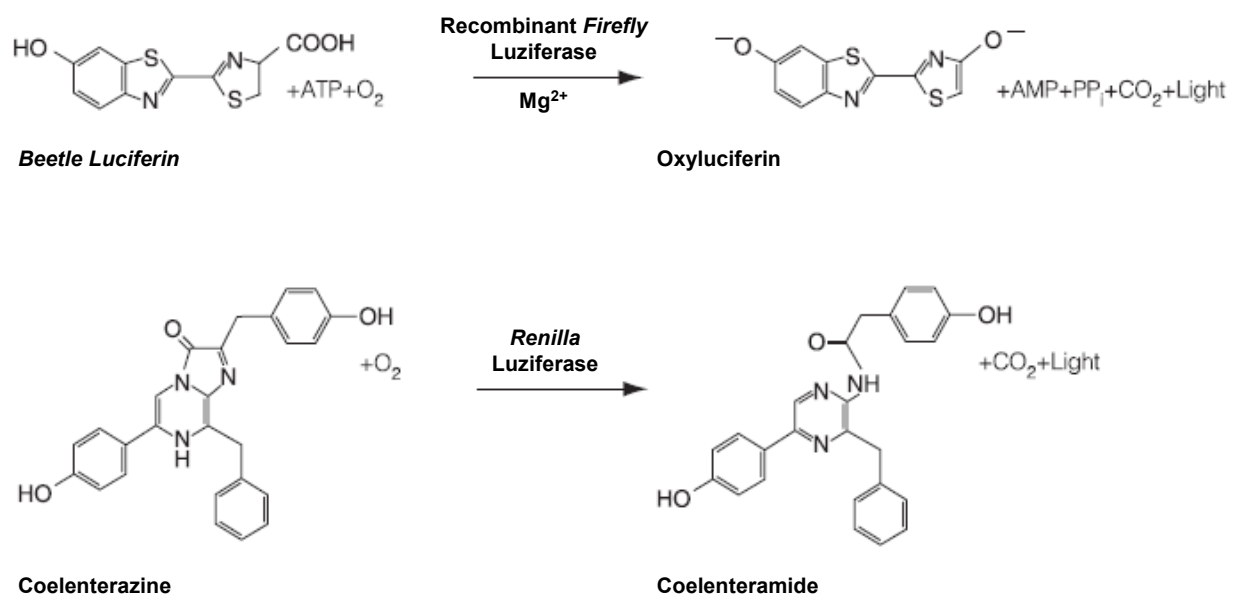
Tab. 13: Liste der verwendeten Plasmide

Name	Beschreibung	Quelle/Referenz
pRL-TK	<i>Renilla</i> -Kontrollplasmid	Promega GmbH, Mannheim
pGL3 Basic	Promotorfreier Reportervektor	Promega GmbH, Mannheim
pT81-Luc	Reportergenvektor mit TK Promotor	[103]
<i>ang-2</i> (-2702/+324)	in pGL3, 5'-Deletionskonstrukt	diese Arbeit
<i>ang-2</i> (-1176/+324)	in pGL3, 5'-Deletionskonstrukt	diese Arbeit
<i>ang-2</i> (-324/+324)	in pGL3, 5'-Deletionskonstrukt	diese Arbeit
<i>ang-2</i> (-100/+324)	in pGL3, 5'-Deletionskonstrukt	diese Arbeit
<i>ang-2</i> (-41/+324)	in pGL3, 5'-Deletionskonstrukt	diese Arbeit
<i>ang-2</i> (-6/+324)	in pGL3, 5'-Deletionskonstrukt	diese Arbeit
<i>ang-2</i> (+10/+324)	in pGL3, 5'-Deletionskonstrukt	diese Arbeit
<i>ang-2</i> (+27/+324)	in pGL3, 5'-Deletionskonstrukt	diese Arbeit
<i>ang-2</i> (-105/+51)	in pT81-Luc	diese Arbeit
<i>ang-2</i> (-105/-56)	in pT81-Luc	diese Arbeit
<i>ang-2</i> (-59/+8)	in pT81-Luc	diese Arbeit
<i>ang-2</i> (+5/+51)	in pT81-Luc	diese Arbeit
<i>ang-2</i> (-2702/+324) M1	in pGL3-Luc, Mutation in GC-Box I	diese Arbeit
<i>ang-2</i> (-2702/+324) M2	in pGL3-Luc, Mutation in GC-Box II	diese Arbeit
<i>ang-2</i> (-2702/+324) M3	in pGL3-Luc, Mutation in GC-Box I + II	diese Arbeit
<i>ang-2</i> (-105/-56)M1	in pT81-Luc, Mutation in GC-Box I	diese Arbeit
<i>ang-2</i> (+5/+51)M2	in pT81-Luc, Mutation in GC-Box II	diese Arbeit
<i>ang-2</i> (-105/+51)M3	in pT81-Luc, Mutation in GC-Box I + II	diese Arbeit
<i>ang-2</i> (-2702/+324) M4	in pGL3-Luc, Mutation in EBS-1	diese Arbeit
<i>ang-2</i> (-2702/+324) M5	in pGL3-Luc, Mutation in EBS-2	diese Arbeit
<i>ang-2</i> (-2702/+324) M6	in pGL3-Luc, Mutation in EBS-3	diese Arbeit
<i>ang-2</i> (-2702/+324) M7	in pGL3-Luc, Mutation in EBS-1+2	diese Arbeit
<i>ang-2</i> (-2702/+324) M8	in pGL3-Luc, Mutation in EBS-1+3	diese Arbeit
<i>ang-2</i> (-2702/+324) M9	in pGL3-Luc, Mutation in EBS-2+3	diese Arbeit
<i>ang-2</i> (-2702/+324) M10	in pGL3-Luc, Mutation in EBS-1+2+3	diese Arbeit

Name	Beschreibung	Quelle/Referenz
pPACSp1	Sp1-cDNA in pPAC	[104]
pPACSp3	Sp3-cDNA in pPAC	[104]
pPACSp1-DBD	DN Sp1 in pPAC (nur DBD, keine AD)	[105]
pPACSp3-DBD	DN Sp3 in pPAC (nur DBD, keine AD)	[106]
Gal4-Luc	Reportergenvektor mit 5XGal4-Bindestellen	[107]
Gal4-Sp1	Gal4-DBD gekoppelt an Sp1-AD	[105]
Gal4-Sp3	Gal4-DBD gekoppelt an Sp3-AD	[108]

### 2.3.3 Dual-Luciferase Assay

24 Stunden nach Transfektion wurden die transfizierten Zellen mittels des *Dual-Luciferase® Reporter Assay Systems* (Promega GmbH, Mannheim) nach Angaben des Herstellers analysiert. Durch dieses System ist die gleichzeitige Quantifizierung der *Firefly* Luziferase des Repotervektors und der *Renilla* Luziferase des Kontrollvektors möglich (Abb. 10).



**Abb. 10: Durch Leuchtkäfer- und *Renilla*-Luziferase katalysierte Biolumineszenz-Reaktion.**

Die Luziferase des Leuchtkäfers katalysiert die Oxidation des Substrats (*Beetle Luciferin*), bei der Photonen emittiert werden, die vom Messgerät quantifiziert werden können. Durch Zugabe des *Renilla*-Luziferase Substrats (Coelenterazine) wird die Reaktion gestoppt und gleichzeitig die *Renilla*-Luziferase Reaktion katalysiert. [modifiziert nach *Dual-Luciferase® Reporter Assay System, Technical Manual*, (Promega GmbH, Mannheim)]

Zur Lyse der Zellen wurden diese mit PBS gewaschen und mit 100 µl PLB (*passive lysis buffer*) überschichtet und für 15 min bei RT auf einem Laborschüttler inkubiert. Anschließend wurden je 25 µl der Lysate in Luminometerröhrchen zur Messung überführt. Die Analyse der Proben erfolgte in einem



*Monolight Luminometer* (Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbach). Der Probe wurden vom Gerät zunächst 25 µl *Luciferase Assay Buffer II* zugeführt und die Lumineszenz der *Firefly* Luziferase quantifiziert. Durch anschließende Zugabe von 25 µl *Stop & Glow® Reagent* wurde diese Reaktion gestoppt und gleichzeitig die *Renilla* Luziferase-Reaktion gestartet und quantifiziert. Die Messung erfolgte in Form von *Relative Light Units* (RLU).

#### 2.3.4 Stimulation von Zellen mit 5-Aza-dC und TSA

Die Zellen wurden in 6-*well* Platten für die Isolierung von RNA bzw. 10 cm Schalen zur Extraktion von genomischer DNA einen Tag vor Beginn der Stimulation ausgesät. 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-dC) wurde in PBS gelöst. Trichostatin A (TSA) wurde dagegen in DMSO gelöst. Das maximal eingesetzte DMSO-Volumen überstieg in der Zellkultur jedoch nicht 0,01% des Gesamtvolumens. Die Zellen wurden mit 5-Aza-dC in unterschiedlichen Konzentrationen über 72 Stunden in Vollmedium kultiviert. Alle 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel sowie der Zusatz von 5-Aza-dC. Zellen wurden dagegen nur für 24 Stunden mit TSA stimuliert. Die Kultivierung erfolgte wiederum in Vollmedium. Bei einer Kombination beider Substanzen wurden die Zellen für 48 Stunden mit 5-Aza-dC und im Anschluss für weitere 24 Stunden mit 5-Aza-dC und TSA stimuliert. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit den Lösungsmitteln PBS oder DMSO inkubiert, um Effekte dieser auf die Expression der untersuchten Gene auszuschließen.

#### 2.3.5 Proliferations-Analyse

Zur Untersuchung der Zellproliferation *in vitro* wurden die Zellen in 24-*well*-Platten mit einer Dichte von 3 bis  $4 \times 10^4$  Zellen pro *well* in Triplikaten ausgesät. Nach 24 Stunden Kultivierung unter Standardbedingungen in Vollmedium wurden die Zellen mit den ausgewiesenen Reagenzien stimuliert (2.3.4). Nach Abschluss der Behandlung wurde der Zellüberstand entfernt und jedes *well* mit PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen mit 100 µl Trypsin vom Boden des Kulturgefäßes gelöst und in 200 µl Medium resuspendiert. Je Asatz wurden 20 µl zur Bestimmung der Zellzahl mittels Trypanblau-Ausschlusstest entnommen. Als Kontrollen dienten unbehandelte bzw. mit den Lösungsmitteln PBS oder DMSO behandelte Zellen.

#### 2.3.6 Lichtmikroskopische Aufnahmen vitaler Zellen

Um Aufnahmen von vitalen Zellen anzufertigen, wurden Zellen in 6-*well*-Platten mit einer Dichte von 1 bis  $2 \times 10^5$  Zellen pro *well* ausgesät. Nach 24 Stunden Kultivierung unter Standardbedingungen in Vollmedium wurden die Zellen mit den ausgewiesenen Reagenzien stimuliert (2.3.4). Nach Abschluss der Behandlung wurde der Zellüberstand entfernt und die *wells* mit PBS gespült, um abgestorbene Zellen zu entfernen. Anschließend wurden die vitalen Zellen in den *wells* mit PBS überschichtet und lichtmikroskopische Aufnahmen mit einem inversen Mikroskop (Axiovert 25; Carl Zeiss Jena GmbH, Jena) und einer Digitalkamera (Nikon D70; Nikon GmbH, Düsseldorf) angefertigt. Die digitale Bildbearbeitung erfolgte mit der Software *Adobe Photoshop CS2* Version 9.0.

### 3 Ergebnisse

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit dem Einfluss von epigenetischen Phänomenen/Prozessen auf das Expressionsprofil von Endothelzellen *in vitro*. Im Vordergrund der Arbeit stand der Einfluss von 5-Aza-2'-desoxycytidin (5-Aza-dC) auf die Expression von angiogeneserelevanten Genen. Detaillierte Untersuchungen wurden zur Expression des Angiogenesefaktors Angiopoetin-2 in endothelialen und epithelialen Ursprungs durchgeführt.

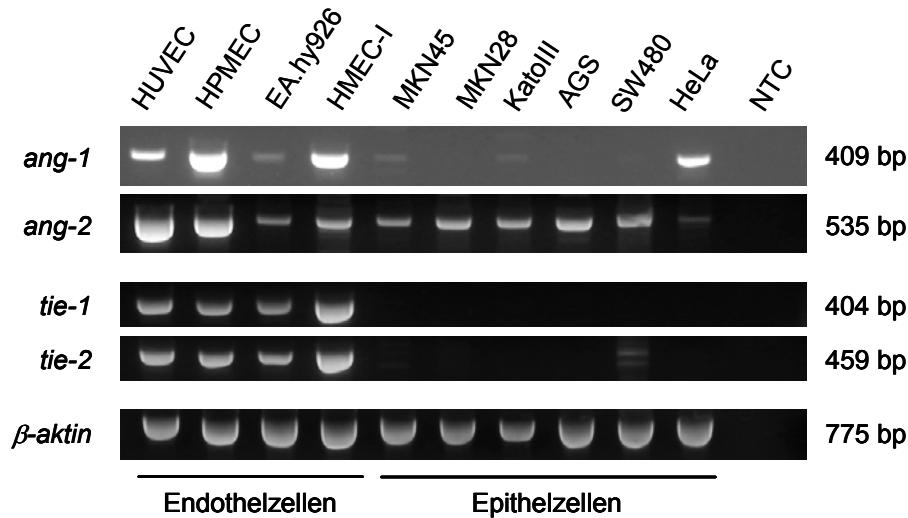
Im zweiten Teil wurde, basierend auf einer basalen Promotorcharakterisierung, die Regulation des humanen *ang-2* Promotors untersucht. Von wesentlicher Bedeutung war die Identifizierung eines regulatorischen Minimalelements, das zur Regulation der *ang-2* Expression ausreichend ist sowie die Bestimmung von regulatorischen Transkriptionsfaktoren, die zur Aktivierung dieses Bereichs führen.

#### 3.1 Untersuchung der *ang-2* Expression in Endothel- und Epithelzellen nach Inkubation mit 5-Aza-2'-desoxycytidin (5-Aza-dC) und Trichostatin A (TSA)

Molekularbiologische Studien haben gezeigt, dass sowohl im Rahmen von physiologischen Prozessen als auch bei einer neoplastischen Läsion der Methylierungsgrad der DNA und des Chromatins und/oder der Acetylierungsgrad der Histone verändert wird. Beide Prozesse können zusammen oder unabhängig voneinander das *gene silencing*, eine Inaktivierung von Genen bewirken. Ein erhöhter Grad methylierter DNA geht dabei mit einer verminderten Transkription und Translation einher. Ebenso ist ein hoher Grad an deacetylierten Histonen mit einer verminderten Transkription assoziiert. Anhand von *ang-2*, dessen Expression im Wesentlichen auf Endothelzellen begrenzt ist, sollte untersucht werden, ob Methylierung und/oder Acetylierung Einfluss auf die *ang-2* Transkription haben.

##### 3.1.1 Expression von Komponenten des Ang-Tie-Systems in Endothel- und Epithelzellen

Um einen Eindruck vom Expressionsprofil verschiedener Komponenten des Ang-Tie-Systems in unterschiedlichen Zellsystemen zu erhalten, wurde die Expression von *ang-1* und *ang-2* sowie der *tie*-Rezeptoren auf mRNA-Basis mittels RT-PCR semiquantitativ untersucht (Abb. 11). In die Analyse waren sowohl Endothelzellen als auch epitheliale Zellen eingeschlossen. Die Expression beider *tie*-Rezeptoren war auf Endothelzellen beschränkt. *Ang-1* wurde in allen Endothelzellen nachgewiesen. Daneben zeigte nur die epitheliale Zelllinie HeLa eine verstärkte *ang-1* Expression, die mit denen der Endothelzellen vergleichbar war. Dagegen exprimierten sowohl endotheliale als auch alle epithelialen Zelllinien *ang-2*, wobei die Expression in den primär kultivierten HUVEC am stärksten war. HeLa Zellen exprimierten *ang-2* nur marginal.

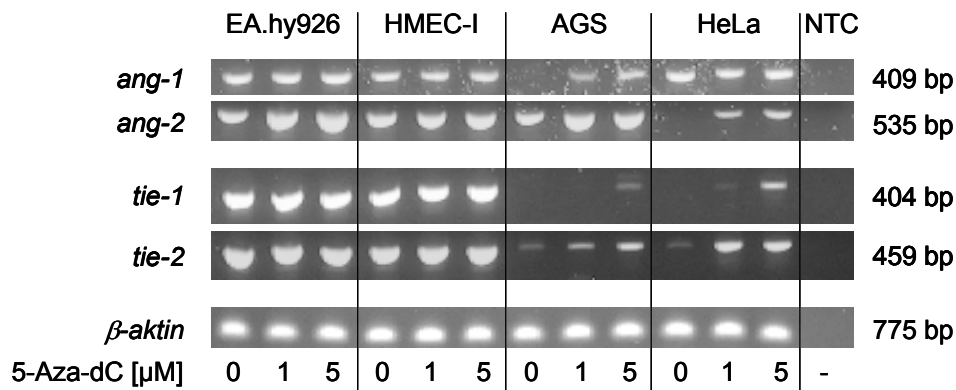


**Abb. 11: Expressionsprofil von Komponenten des Ang-Tie-Systems in verschiedenen Endothel- und Epithelzelllinien.**

Die Expression von *ang-1*, *ang-2*, *tie-1* sowie *tie-2* wurde mit Hilfe von RT-PCR analysiert. Die  $\beta$ -aktin Expression wurde hinzugezogen, um eine einheitliche Effizienz der reversen Transkription zu demonstrieren. NTC – non template control

Aufgrund der unterschiedlichen Expressionsprofile von Komponenten des Ang-Tie-Systems in Endothel- und Epithelzellen (Abb. 11) wurde untersucht, ob durch Hemmung der DNA-Methyltransferase 1 (DNMT1) mittels 5-Aza-dC die Expression der einzelnen Gene beeinflusst werden kann. Dazu wurden Zellen der endothelialen Zelllinien EA.hy926 und HMEC-I sowie Zellen epithelialen Ursprungs (AGS und HeLa) mit unterschiedlichen Konzentrationen des demethylierenden Agens 5-Aza-dC über 72 Stunden behandelt und die Expression semiquantitativ auf RNA-Basis bestimmt. Die Behandlung von Zellen mit 5-Aza-dC während der Wachstumsphase führt aufgrund der Hemmung der DNMT1 zu einem Verlust des spezifischen DNA-Methylierungsmusters und zieht eine Veränderung des Expressionsprofils nach sich. Gene, welche von unbehandelten Zellen zunächst nicht exprimiert werden, können entweder durch Hypomethylierung ihrer Promotoren direkt oder aber indirekt durch Beeinflussung von anderen epigenetisch regulierten Genen induziert werden.

Die *ang-1* Expression in den Endothelzellen sowie HeLa Zellen wurde durch 5-Aza-dC nicht beeinflusst. In AGS Zellen wurde *ang-1* durch Behandlung mit 5-Aza-dC induziert. In allen Zelllinien wurde die Expression von *ang-2* durch Demethylierung gesteigert. Für HeLa Zellen war nach 5-Aza-dC Behandlung eine deutliche *ang-2* Expression im Agarosegel nachweisbar. Die Gene *tie-1* und *tie-2* wurden nach der Behandlung mit 5  $\mu$ M 5-Aza-dC in beiden epithelialen Zelllinien exprimiert. In Endothelzellen hatte 5-Aza-dC keinen Einfluss auf die Genexpression der *tie*-Rezeptoren.  $\beta$ -aktin, das als Kontrolle mitgeführt wurde, war von keinen Veränderungen betroffen und bestätigte die selektiven Effekte von 5-Aza-dC auf die Expression der ausgewiesenen Gene (Abb. 12).



**Abb. 12: Einfluss von Demethylierung mittels 5-Aza-dC auf die Expression von Komponenten des Ang-Tie-Systems in verschiedenen Zelllinien.**

Die *ang-2* Expression wurde in allen Zelllinien durch Demethylierung induziert. Weiterhin stieg die Expression von *tie-1* und *tie-2* in den Epithelzelllinien AGS und HeLa mit der 5-Aza-dC Konzentration an. Die Expression wurde hinzugezogen, um eine einheitliche Effizienz der reversen Transkription zu demonstrieren. NTC – *non template control*

### 3.1.2 Einfluss von 5-Aza-dC und TSA auf Morphologie und Proliferation

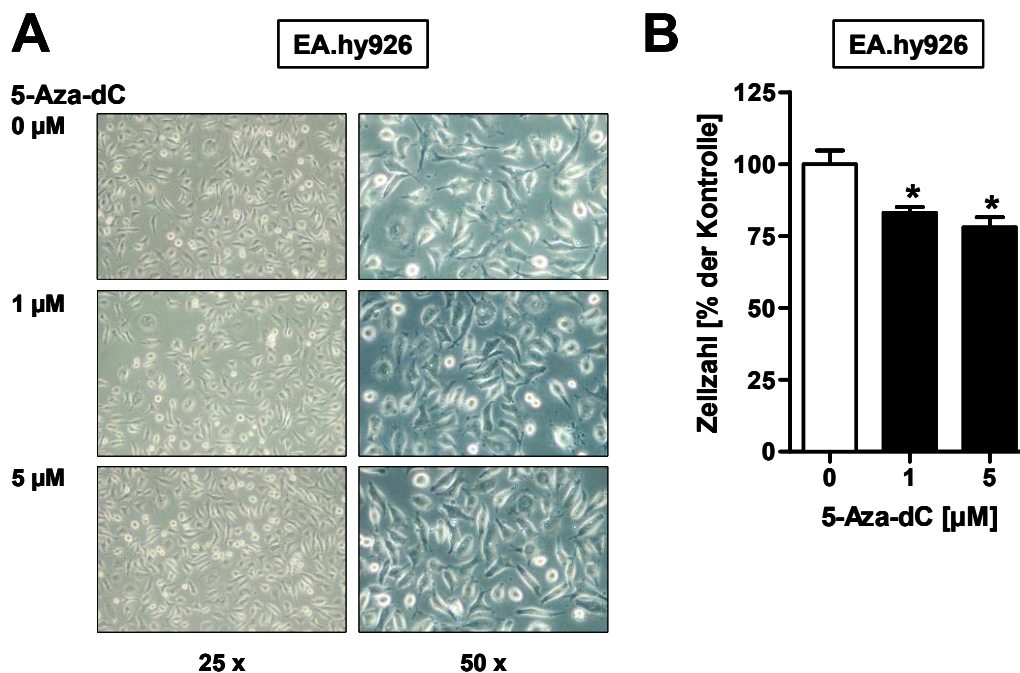
Bevor weitere Versuche durchgeführt werden konnten, mussten die verwendeten Substanzen 5-Aza-dC und TSA bezüglich ihrer Toxizität in den verwendeten Zellsystemen validiert werden. Es sollte ausgeschlossen werden, dass Änderungen der Genexpression auf toxische Eigenschaften der eingesetzten Reagenzien beruhten. Exemplarisch werden die Daten zur Endothelzelllinie EA.hy926 gezeigt.

#### 3.1.2.1 Wirkung von 5-Aza-dC

Durch DNA-Methylierung kann die Transkription direkt inhibiert werden, indem die Bindung von Transkriptionsfaktoren verhindert wird. Die meisten Transkriptionsfaktoren in Säugern verfügen über GC-reiche Bindungsmotive, die oft CpG-Dinucleotide enthalten. Um eine Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA zu ermöglichen, müssen die Faktoren mit Cytosinen in der großen Furche der DNA Kontakt aufnehmen. Eine Methylierung der entsprechenden Cytosine kann die Bindung von Transkriptionsfaktoren verhindern und die Genexpression unterdrücken. Alternativ können über CpG-Methylierung die Bindung des Transkriptionsapparats an methylierte Promotor-DNA inhibiert und Gene direkt inaktiviert werden [86]. Der Vorgang der Methylierung von DNA wird durch DNA-Methyltransferasen (DNMT) vermittelt. Durch den Inhibitor 5-Aza-dC und dessen kovalente Bindung an DNMTs werden diese Enzyme inaktiviert. Dies führt zu einer Reduktion an Methyltransferase-Aktivität in den Zellen und resultiert in einer schnellen passiven DNA-Demethylierung und einer möglichen Induktion von vorher inaktiven Genen [109].

Um negative Einflüsse von 5-Aza-dC auf die Zellen auszuschließen, wurden exemplarisch Änderungen in Morphologie und Proliferation der Zelllinien EA.hy926 näher untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit Endkonzentrationen von 1  $\mu$ M bzw. 5  $\mu$ M 5-Aza-dC in Vollmedium über 72 Stunden kultiviert. Das Medium sowie 5-Aza-dC wurden jeweils nach 24 Stunden gewechselt. Für

die Wirksamkeit muss das Nukleosidanaloga während der Replikationsphase in die DNA integriert werden und die Zellen dafür mindestens einen Teilungszyklus unter Inkubation mit 5-Aza-dC durchlaufen. Die Inkubationszeit von 72 Stunden ist für eine Inkorporation des DNMT-Inhibitors ausreichend. Als Negativkontrolle wurden Zellen ohne Zusatz von 5-Aza-dC in Vollmedium kultiviert. Durch Gabe des demethylierenden Reagenz konnten im Lichtmikroskop nach 72 Stunden Inkubation keine morphologischen Unterschiede zwischen Kontrolle und behandelten Zellen festgestellt werden. Durch die Inkubation mit 5-Aza-dC wurde ein leichter Rückgang der Proliferation der Endothelzellen beobachtet. Es wurden lichtmikroskopische Aufnahmen der vitalen Zellen angefertigt (Abb. 13A) sowie die Proliferation von EA.hy926 Zellen näher quantifiziert (Abb. 13B).



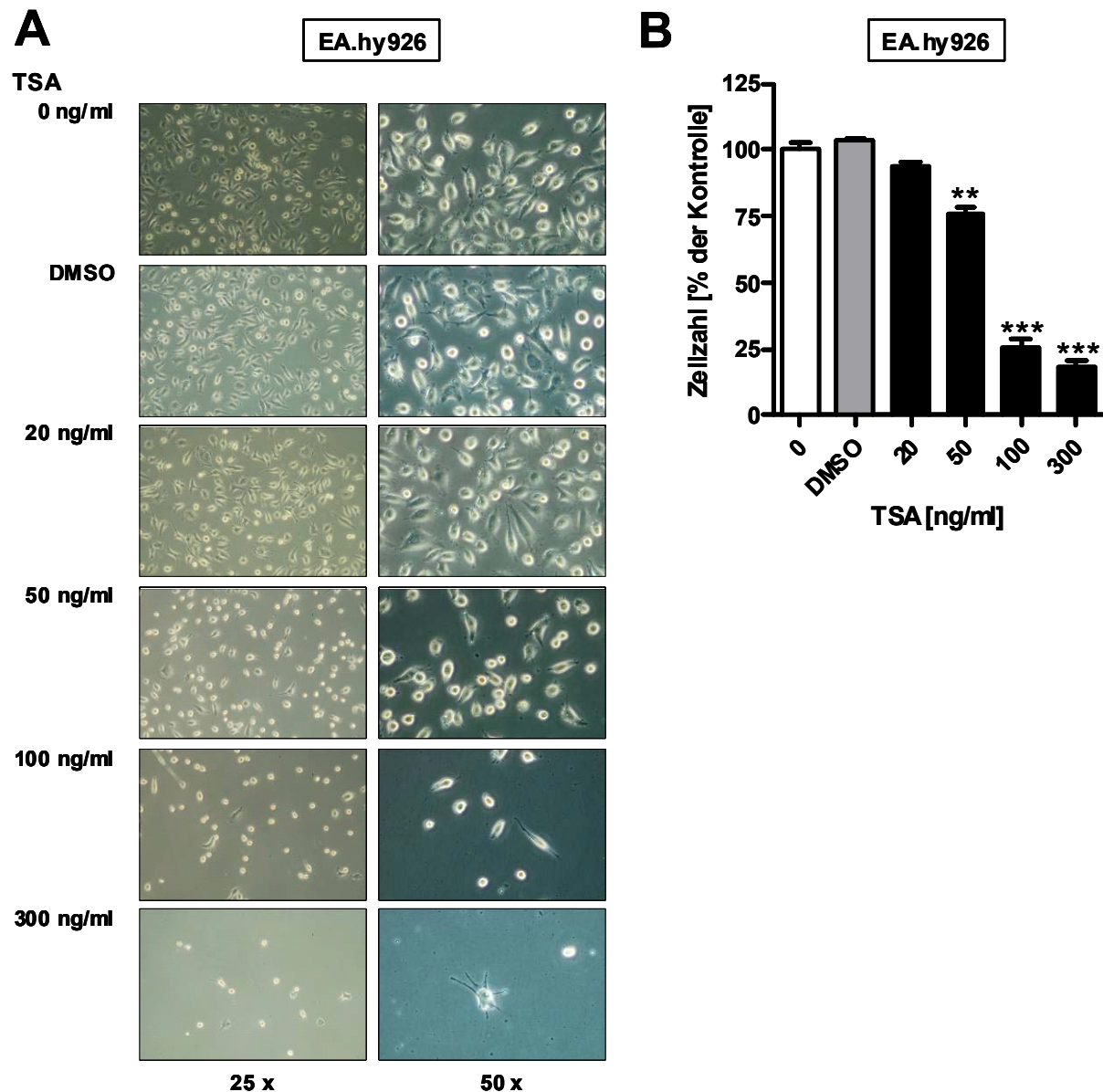
**Abb. 13: Die demethylierende Substanz 5-Aza-dC hat keinen negativen Einfluss auf Morphologie und Proliferation von EA.hy926 Zellen.**

Durch die Verwendung von 5-Aza-dC konnten keine morphologischen Veränderungen an den Endothelzellen EA.hy926 (A) festgestellt werden. Die Proliferation der Zellen fiel geringfügig gegenüber der Kontrolle während der Behandlung ab (B). Signifikanzen wurden mittels Student's t-Test berechnet (\* =  $p < 0,05$ )

### 3.1.2.2 Wirkung von TSA

Die Acetylierung von Histonen ist ein zweiter wichtiger Prozess in der epigenetischen Regulation der Genexpression. Durch die Acetylierung von Lysin-Resten am N-terminalen Ende von Histon-Proteinen werden positive Ladungen neutralisiert und somit die Affinität zwischen Histonen und DNA herabgesetzt. RNA-Polymerasen und Transkriptionsfaktoren erhalten aufgrund der gelockerten Chromatinstruktur erleichterten Zugang zur DNA. Histon-Acetylierung ist somit vorrangig mit einer Genaktivierung assoziiert. Deacetylierung korreliert auf der anderen Seite mit einer Repression der Transkription. Katalysiert werden diese Prozesse durch Histon-Acetyltransferase (HAT) sowie Histon-Deacetylasen (HDAC). Mit Hilfe von HDAC-Inhibitoren, z.B. TSA, ist es möglich die Expression von

Genen zu steigern, da die kondensierte hypoacetylierte Chromatinstruktur durch eine Hemmung der Deacetylasen aufgehoben wird.



**Abb. 14: Toxische Wirkung von TSA auf EA.hy926 Zellen.**

Aufgrund der Behandlung mit dem Histon-Deacetylase-Inhibitor TSA traten lichtmikroskopische Veränderungen an EA.hy926 Zellen auf. Mit zunehmender TSA Konzentration kam es zu einer Ausdünnung des Zellrasens (A). Insbesondere der Einsatz von 100 bzw. 300 ng/ml TSA führte zum Absterben von Zellen aufgrund einer wahrscheinlichen Toxizität. Mit steigender TSA Konzentration fiel die Proliferation der behandelten Zellen gegenüber der Kontrolle ab. Der Rückgang der Proliferation war bei EA.hy926 Zellen nach Behandlung mit 100 und 300 ng/ml TSA signifikant (B). Eine Schädigung durch das Lösungsmittel DMSO konnte ausgeschlossen werden. Signifikanzen wurden mittels Student's t-Test berechnet (\*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ )

Exemplarisch wurde an der Endothelzelllinie EA.hy926 der Einfluss von TSA ähnlich wie für 5-Aza-dC untersucht, um toxische Wirkungen von TSA auszuschließen (Abb. 14). Nach Kultivierung der EA.hy926 Zellen für 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen TSA (20, 50, 100 und 300 ng/ml) oder DMSO als Kontrolle in Vollmedium, wurden Veränderungen im Wachstum der

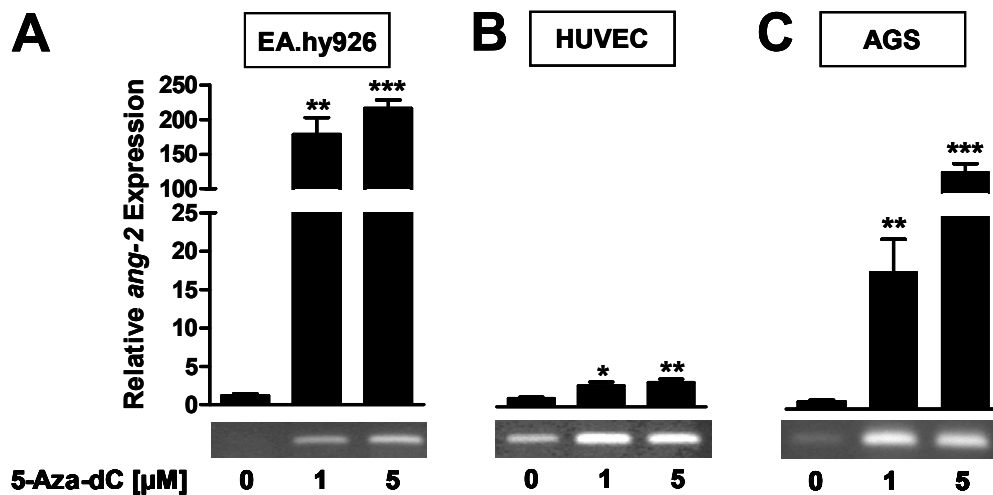
Endothelzellen beobachtet. Lichtmikroskopische Bilder der vitalen Zellen wurden nach 24 Stunden TSA-Behandlung aufgenommen. Es war eine deutliche Ausdünnung des Zellrasens mit zunehmender TSA Konzentration zu erkennen. Bei Einsatz der zwei höchsten Konzentrationen von TSA (100 und 300 ng/ml) waren diese Veränderungen am stärksten ausgeprägt (Abb. 14A). Bekräftigt wurden diese Beobachtungen durch die Veränderung der Zellzahl nach TSA-Behandlung, die einen signifikanten Rückgang mit steigender TSA-Konzentration aufzeigte (Abb. 14B). Die Schädigungen, die mit einer höheren Sterblichkeit der Zellen einherging, waren höchstwahrscheinlich auf die Toxizität von TSA zurückzuführen. Das Lösungsmittel DMSO, welches in einer maximalen Konzentration von 0,01% verwendet wurde, konnte als schädigendes Agens in diesen Versuchen aufgrund der lichtmikroskopischen Bilder ausgeschlossen werden.

### 3.1.3 Einfluss von 5-Aza-dC auf die *ang-2* Expression

Erste Untersuchungen haben gezeigt, dass die Expression von *ang-2* sowohl in Endothel- als auch in Epithelzellen durch Demethylierung gesteigert wurde (Abb. 12). Dieses Ergebnis wies auf eine Regulation von *ang-2* durch Methylierungsvorgänge hin. In einem nächsten Schritt wurde eine quantitative Untersuchung der *ang-2* Expression mittels *Real-Time* RT-PCR in Endothelzellen und der Magenkarzinomzelllinie AGS durchgeführt. Dazu wurden Zellen der endothelialen Zelllinien EA.hy926, die Primärzellen HUVEC sowie AGS Zellen mit 1  $\mu$ M bzw. 5  $\mu$ M 5-Aza-dC in Vollmedium kultiviert.

Die semiquantitative Analyse der Expression mittels der Darstellung im Agarosegel zeigt deutliche Unterschiede der basalen Expression von *ang-2* in unbehandelten Zellen. Während EA.hy926 und AGS Zellen keine im Agarosegel detektierbare basale *ang-2* Expression aufwiesen, zeichneten sich HUVEC Zellen bereits durch eine deutliche basale *ang-2* Expression aus. In allen drei Fällen war eine deutliche Induktion nach Gabe von 5-Aza-dC zu erkennen, die durch die Erhöhung der Konzentration von 1  $\mu$ M auf 5  $\mu$ M zusätzlich gesteigert werden konnte. Der semiquantitative Vergleich aller untersuchten Zellen zeigte, dass die basale *ang-2* Expression in Abwesenheit des demethylierenden Reagenz in HUVEC Zellen am stärksten detektierbar war (Abb. 15).

Zur quantitativen Analyse der *ang-2* Expression mittels *Real-Time* RT-PCR wurde nach 72h die Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und diese dann in der *Real-Time* RT-PCR eingesetzt. Zur Normalisierung wurden in parallelen Ansätzen die Expression des *housekeeping*-Gens  $\beta$ -aktin bestimmt. Die quantitative Analyse verdeutlichte, dass nach einer 72-stündigen Behandlung der EA.hy926 Zellen mit 5-Aza-dC die *ang-2* Expression im Vergleich mit den nicht behandelten Zellen signifikant erhöht wurde. Bereits 1  $\mu$ M der demethylierenden Substanz steigerten die relative *ang-2* mRNA auf das 178-fache gegenüber der Kontrolle ( $p < 0,01$ ) und konnte unter 5  $\mu$ M 5-Aza-dC auf das über 200-fache induziert werden ( $p < 0,001$ ) (Abb. 15A). Auch in den primären Endothelzellen HUVEC führte 5-Aza-dC zu einer Steigerung von *ang-2*, die jedoch weit unter den Werten in EA.hy926 Zellen lag (Abb. 15B). In der Karzinomzelllinie AGS konnte ebenfalls eine signifikant gesteigerte Induktion nach Gabe von 5'-Aza-dC gezeigt werden. Durch Erhöhung der 5-Aza-dC Konzentration auf 5  $\mu$ M stieg die *ang-2* Expression vom 27-fachen nach Behandlung mit 1  $\mu$ M 5-Aza-dC ( $p < 0,01$ ) auf das 130-fache ( $p < 0,001$ ) im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 15C).



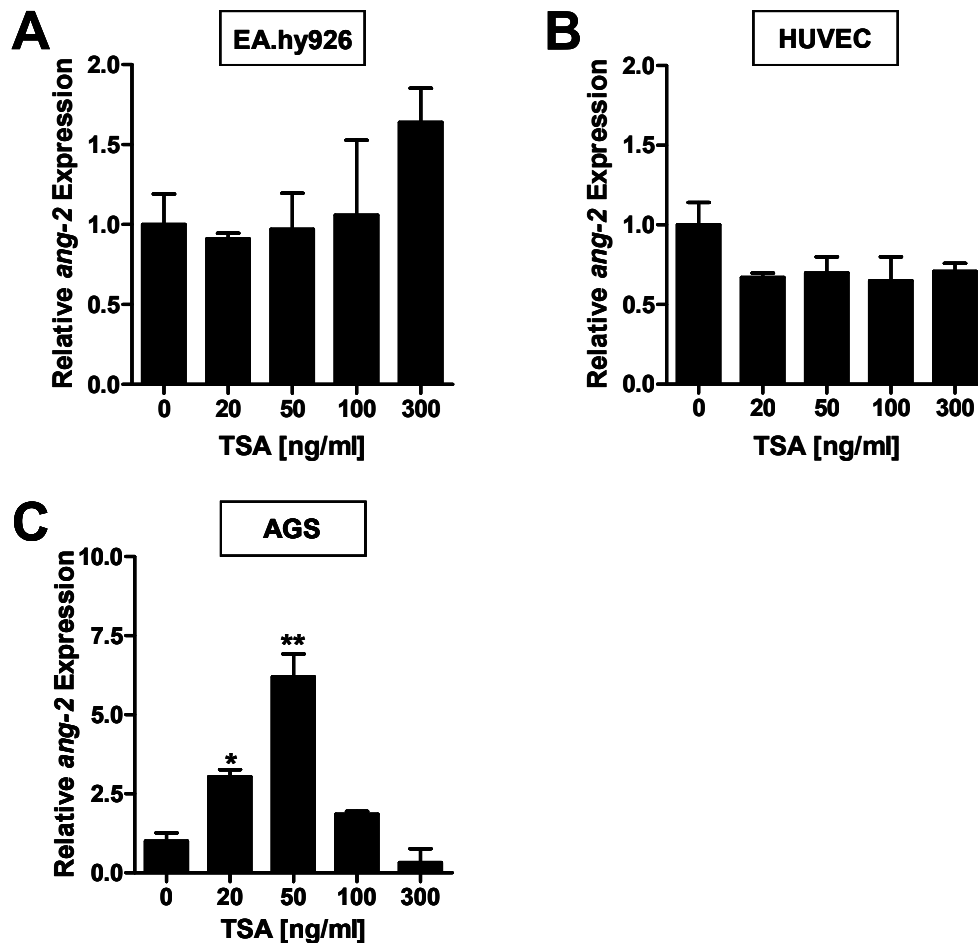
**Abb. 15: Gesteigerte *ang-2* Expression durch Änderung des globalen Methylierungsstatus in Endothel- und Epithelzellen mit Hilfe der demethylierenden Substanz 5-Aza-dC.**

Zellen der endothelialen Zelllinien EA.hy926 (A) und HUVEC (B) sowie die Epithelzellen AGS (C) wurden über 72 Stunden mit 5-Aza-dC inkubiert und anschließend die *ang-2* Expression mittels *Real-Time* RT-PCR untersucht. Entsprechende Proben wurden auf ein Agarosegel aufgetragen. In allen drei Zelllinien wurde durch 5-Aza-dC konzentrationsabhängig *ang-2* signifikant induziert. Die höchste Induktion (200-fach) konnte in EA.hy926 gezeigt werden. In HUVEC kam es zu einer 4,5-fachen Induktion nach 5-Aza-dC Gabe. Die Induktion ist ebenfalls im Agarosegel deutlich zu erkennen. In der Epithelzelllinie AGS wurde *ang-2* um das 130-fache induziert. Ebenfalls zu erkennen ist die unterschiedliche *ang-2* Basalexpression. Signifikanzen wurden mittels Student's t-Test berechnet (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

### 3.1.4 Einfluss von TSA auf die *ang-2* Expression

Um die Auswirkung von Acetylierung auf die *ang-2* Expression in den Zelllinien EA.hy926 und den Primärzellen HUVEC sowie in Zellen der Magenkarzinomzelllinie AGS zu untersuchen, wurden die Zellen für 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen des HDAC-Inhibitors TSA (20, 50, 100 und 300 ng/ml) oder DMSO als Kontrolle in Vollmedium kultiviert. Zur quantitativen Analyse der *ang-2* Expression mittels *Real-Time* RT-PCR wurde wie in 3.1.3 beschrieben die Gesamt-RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Zur Normalisierung wurde wiederum die Expression des *housekeeping*-Gens  $\beta$ -aktin bestimmt. In den untersuchten Endothelzelllinien EA.hy926 und HUVEC konnten keine signifikanten Unterschiede in der relativen Expression von *ang-2* gemessen werden (Abb. 16A und B). In der Tendenz war eher eine Abnahme als eine Induktion der Expression zu beobachten, die wahrscheinlich auf die gezeigte Toxizität von TSA (Abb. 14) zurückzuführen ist. Zusammenfassend hatte TSA bzw. die damit verbundene Acetylierung keinen Einfluss auf die *ang-2* Expression in den Endothelzellen. In AGS Zellen wurde dagegen die relative *ang-2* Expression durch 20 bzw. 50 ng/ml TSA signifikant induziert (Abb. 16C).





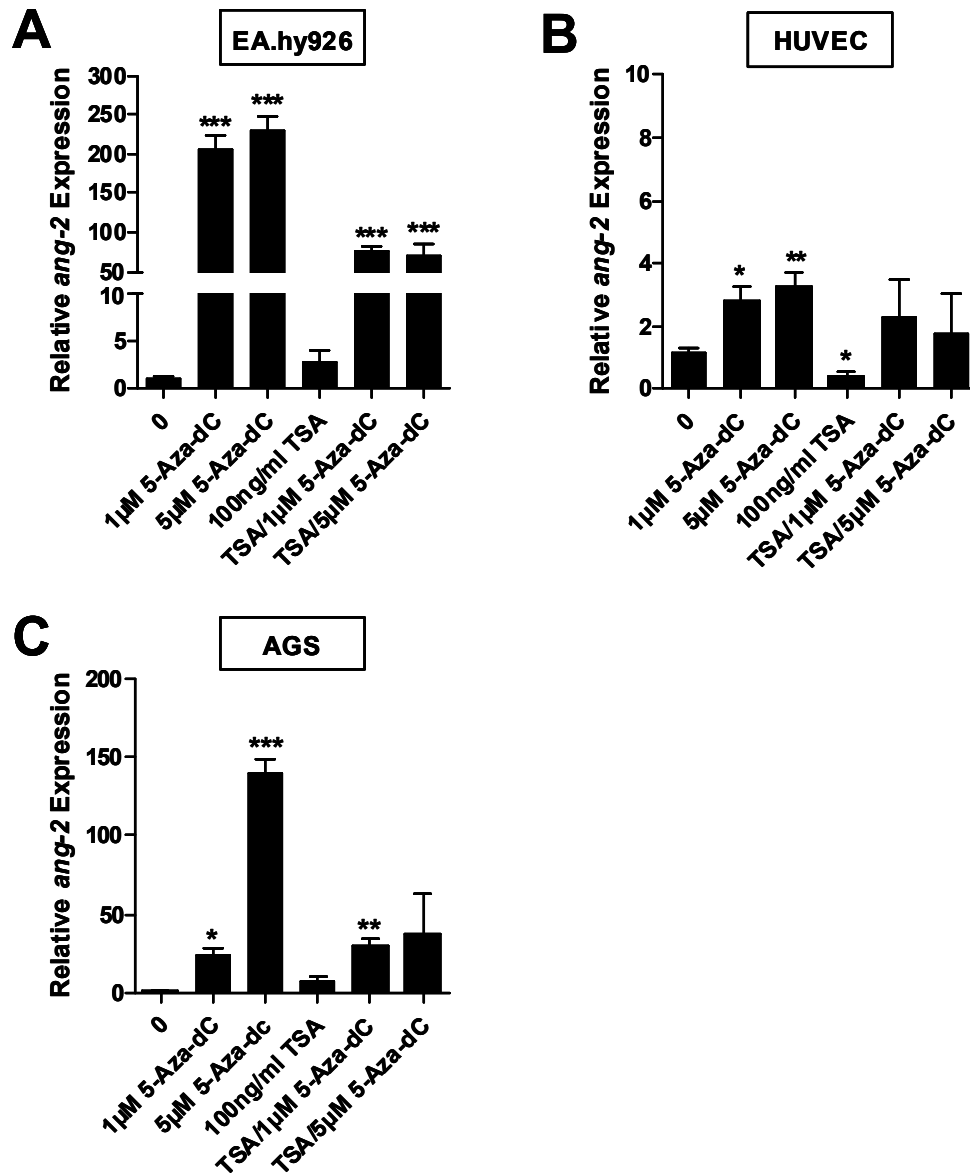
**Abb. 16:** Die Wirkung des Histon-Deacetylase-Inhibitors TSA hat keinen Einfluss auf die *ang-2* Expression in Endothelzellen. In Epithelzellenzellen wurde *ang-2* induziert.

Zellen der endothelialen Zelllinien EA.hy926 (A), Primärzellen HUVEC (B) und der Magenkarzinomzelllinie AGS (C) wurden über 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen des HDAC-Inhibitors TSA inkubiert. Die anschließende Analyse der relativen *ang-2* Expression mittels *Real-Time* RT-PCR zeigte in keiner der endothelialen Zellen signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle, die mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt wurden. In der Epithelzelllinie AGS wurde die relative *ang-2* Expression durch 50 ng/ml TSA signifikant induziert (C). Signifikanzen wurden mittels Student's t-Test berechnet (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ).

### 3.1.5 Auswirkung der kombinierten Behandlung mit 5-Aza-dC und TSA auf die *ang-2* Expression

Bei der Untersuchung von epigenetischen Mechanismen ist zu beachten, dass DNA-Methylierung dominant gegenüber der Histon-Acetylierung ist. Es konnte demnach vermutet werden, dass der ausbleibende Effekt der TSA-Behandlung auf die *ang-2* Expression (Abb. 16) auf diese Tatsache zurückzuführen war. Aus diesem Grund wurden die Zellen über 72 Stunden mit 5-Aza-dC behandelt, wobei während der letzten 24 Stunden eine gleichzeitige Inkubation der Zellen mit TSA erfolgte (Abb. 17). Weder in den Endothel- noch in den Epithelzellen konnten additive Effekte durch die Kombination von 5-Aza-dC und TSA beobachtet werden. In EA.hy926 und AGS Zellen führte die Zugabe von TSA zu einer Repression der *ang-2* Expression (Abb. 17A und C). In HUVEC Zellen blieb die *ang-2* Expression nach Kombination von 5-Aza-dC und TSA auf dem vergleichbaren Niveau wie

nach alleiniger 5-Aza-dC Inkubation (Abb. 17B). Dies sind Hinweise darauf, dass die Änderung der relativen *ang-2* Expression auf die globale Demethylierung mittels 5-Aza-dC zurückzuführen ist und in keinem Zusammenhang zur Veränderung des Acetylierungsstatus von Histonen durch TSA steht.



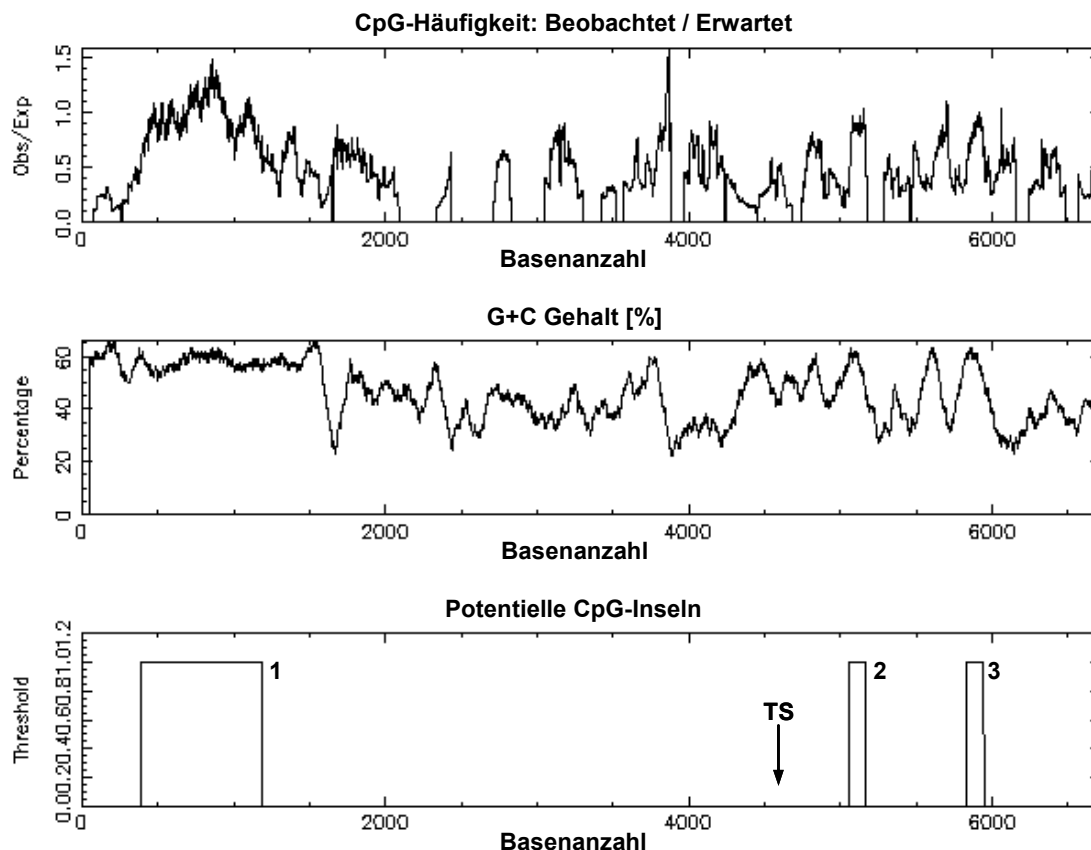
**Abb. 17: Kein additiver Effekt von 5-Aza-dC und TSA auf die *ang-2* Expression.**

Durch die Kombination von Demethylierung mittels 5-Aza-dC und einer gesteigerten Histonacetylierung durch Behandlung mit TSA wurde keine additive Wirkung in Bezug auf die *ang-2* Expression gemessen. In EA.hy926 (A) und AGS (C) Zellen fiel die relative *ang-2* Expression durch die Inkubation mit beiden Substanzen im Vergleich zur 5-Aza-dC-Behandlung deutlich ab. Signifikanzen wurden mittels Student's t-Test berechnet (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

### 3.1.6 Identifizierung CpG-reicher Regionen im *ang-2* Gen

Die bisherigen Versuche hatten gezeigt, dass durch globale Demethylierung mit Hilfe des DNMT-Inhibitors 5-Aza-dC die *ang-2* Expression in Zellen endothelialen und epithelialen Ursprungs gesteigert werden konnte. Mittels eines CpG-Plots wurde die genomische *ang-2* Sequenz nach CpG-reichen Abschnitten untersucht und eine Vorhersage zu potentiellen CpG-Inseln getroffen. Die Analyse auf der Plattform des *European Bioinformatic Institute* (EBI, Cambridge UK) erfolgte nach den von Gardiner-Garden und Frommer [82] vorgeschlagenen Kriterien für CpG-Inseln.

Drei CpG-reiche Regionen wurden mit dem EMBOSS-CpG-Plot (*The European Molecular Biology Open Software Suite*) identifiziert. Diese sind an den Positionen -4208 bis -3413 (796 bp), +467 bis +567 (101 bp) und +1239 bis +1352 (114 bp) relativ zum Transkriptionsstart (TS) gelegen. Die Sequenzen weisen alle GC-Anteile von über 50% auf und besitzen ein CpG-Vorkommen mit einem CpG-Verhältnis Beobachtet/Erwartet von  $>0,60$ . Jedoch hat ausschließlich die CpG-reiche Region, welche sich von Position -4208 bis -3413 distal vom Transkriptionsstart erstreckt, die erforderliche Länge von  $\geq 200$  bp, die eine CpG-Insel nach Definition von Gardiner-Garden und Frommer [82], haben sollte. Die beiden kürzeren CpG-reichen Regionen liegen innerhalb der proteinkodierenden Region (Abb. 18).



**Abb. 18:** CpG-Plot der *ang-2* Sequenz.

Es wurden drei potentielle CpG-Inseln identifiziert, die einen GC-Anteil von über 50% und ein CpG-Vorkommen mit einem CpG-Verhältnis Beobachtet/Erwartet von  $>0,60$  besitzen. Jedoch hat nur die CpG-reiche Region 1 die erforderliche Länge von  $\geq 200$  bp. Durch den Pfeil ist die ungefähre Lage des Transkriptionsstarts (TS) gekennzeichnet.

### 3.2 Untersuchung der globalen Demethylierung in Endothelzellen durch 5-Aza-dC mittels explorativer *Microarray*-Untersuchung

Um einen weitreichenden Eindruck über die Verhältnisse in Endothelzellen nach Demethylierung zu erlangen, wurde der Ansatz des explorativen *Microarrays* gewählt. Mit Hilfe von *Microarrays* können die Expressionsprofile von einer Vielzahl von Genen parallel erfasst werden. In den Untersuchungen wurde der *Whole Human Genome Oligo Microarray (4x44k)* der Firma Agilent verwendet. Die Auswertung der gemessenen Signale erfolgte mit dem Programm *GeneSpring* Version 4.2.

Für die *Microarray*-Versuche wurden die Endothelzelllinie EA.hy926 sowie die primär kultivierten HUVEC ausgewählt. Mit Hilfe des *Arrays* sollten potentielle Mediatoren gefunden werden, welche die Induktion von *ang-2* in den Zellsystemen nach 5-Aza-dC Behandlung erklären könnten. Voruntersuchungen hatten gezeigt, dass EA.hy926 Zellen sensibler auf 5-Aza-dC reagieren als die HUVEC Zellen. Aus diesem Grund wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von 5-Aza-dC behandelt: EA.hy926 Zellen wurden über 72 Stunden mit 5-Aza-dC im unteren Konzentrationsbereich (0,1 bis 1,0  $\mu\text{M}$ ) inkubiert, HUVEC Zellen dagegen mit den höheren Konzentrationen 1,0 und 5,0  $\mu\text{M}$  5-Aza-dC. Gene wurden als differentiell reguliert eingestuft, wenn die *Fold Change* (FC)  $>2$  bzw.  $<0,5$  war.

#### 3.2.1 Auswertung des *Microarrays* mit EA.hy926 Zellen

Die bioinformatische Auswertung der *Microarray*-Daten zeigte, dass in EA.hy926 Zellen mit steigender Konzentration von 5-Aza-dC die Anzahl der differentiell regulierten *Probe Sets* zunahm (Tab. 14). Die Eingrenzung auf wahrscheinlich angiogeneserelevante Gene aus einer noch unveröffentlichten Metaanalyse von Anders *et al.* (ANGIOGENESE-LISTE<sup>10</sup>), die durch 798 *Probe Sets* auf dem *Array* repräsentiert wurden, zeigte ebenfalls eine dosisabhängige Expressionsänderung auf. Dabei wurden nicht nur Transkripte herausgefiltert, die induziert wurden, sondern auch solche, die einer Expressionsrepression unterlagen.

Tab. 14: Allgemeine Gegenüberstellung der Anzahl der regulierten *Probe Sets*<sup>11</sup> nach globaler Demethylierung mittels 5-Aza-dC in EA.hy926 Zellen.

5-Aza-dC	Anzahl der regulierten <i>Probe Sets</i> <sup>12</sup>		Anzahl der regulierten <i>Probe Sets</i> der ANGIOGENESE-LISTE	
	Induktion (FC $>2$ )	Repression (FC $<0,5$ )	Induktion (FC $>2$ )	Repression (FC $<0,5$ )
0,1 $\mu\text{M}$	5.014 (8,4%) <sup>13</sup>	3.650 (6,1%)	83 (10,4%) <sup>14</sup>	62 (7,8%)
0,5 $\mu\text{M}$	6.023 (10,0%)	3.156 (5,3%)	128 (16,0%)	49 (6,1%)
1,0 $\mu\text{M}$	7.053 (11,8%)	3.161 (5,3%)	148 (18,6%)	58 (7,3%)

<sup>10</sup> Liste von angiogeneserelevanten Genen von Anders *et al.* Persönliche Kommunikation.

<sup>11</sup> Einige Transkripte sind durch mehrere *Probe Sets* auf dem *Microarray* vertreten.

<sup>12</sup> *Microarray* Genliste von Agilent: *Whole Human Genome Oligo Microarray 4x44k*

<sup>13</sup> Bezogen auf Gesamtzahl an *Probe Sets* auf dem *Microarray* von Agilent: 59.950 *Probe Sets*.

<sup>14</sup> Bezogen auf die ANGIOGENESE-LISTE von Anders *et al.*: 798 *Probe Sets*.

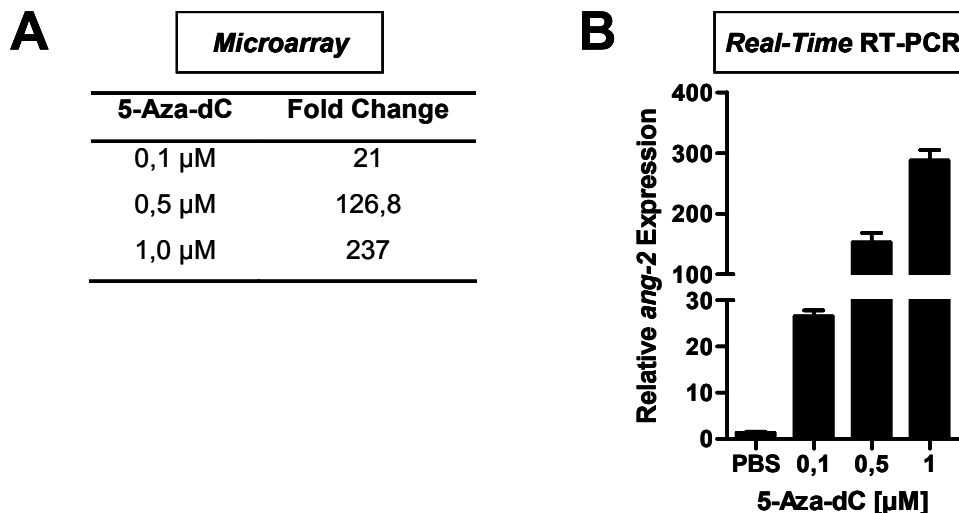
Bei einer näheren Betrachtung der regulierten *Probe Sets* wurde eine Konzentrationsabhängigkeit nachgegangen (Tab. 15). Hier sollte ein direkter Zusammenhang zwischen der steigenden 5-Aza-dC Konzentration und der veränderten Expression der Transkripte untersucht werden. Für 784 *Probe Sets* auf dem *Microarray* (15 ANGIOGENESE-LISTE) wurde eine steigende Expression mit ansteigender 5-Aza-dC Konzentration nachgewiesen. Dagegen wurden nur 92 bzw. 2 *Probe Sets* gefiltert, die bezüglich ihrer Expression unter diesen strengeren Kriterien einer konzentrationsabhängigen Repression unterlagen.

**Tab. 15: Anzahl der *Probe Sets*, die durch 5-Aza-dC konzentrationsabhängig in EA.hy926 Zellen reguliert wurden.**

Anzahl induzierten <i>Probe Sets</i> (FC>2)		Anzahl der herunterregulierten <i>Probe Sets</i> (FC<0,5)	
AGILENT <i>MICROARRAY</i>	ANGIOGENESE - LISTE	AGILENT <i>MICROARRAY</i>	ANGIOGENESE - LISTE
784 (1,3%)	15 (1,9%)	92 (0,2%)	2 (0,3%)

### Expression von *ang-2*

Im *Microarray* wurde unter anderem *ang-2* als Gen identifiziert, dessen Expression durch 5-Aza-dC in EA.hy926 Zellen konzentrationsabhängig gesteigert wurde (Abb. 19A). Die gleichen Proben wurden mittels *Real-Time* RT-PCR auf *ang-2* Expression untersucht (Abb. 19B). Die Daten waren in guter Übereinstimmung mit den *Microarray*-Daten. Die PCR-basierten Expressionsdaten waren jedoch im Durchschnitt höher. Diese Abweichungen waren auf die größere Sensitivität dieser Methode gegenüber dem *Microarray* zurückzuführen.



**Abb. 19: Vergleich der Daten zur Änderung der *ang-2* Expression aus *Microarray* (A) und quantitativer *Real-Time* RT-PCR (B) in EA.hy926 Zellen.**

### 3.2.2 Auswertung des *Mircoarrays* mit HUVEC Zellen

Voruntersuchungen hatten gezeigt, dass HUVEC Zellen weniger sensitiv auf 5-Aza-dC reagieren als EA.hy926 Zellen, weshalb höhere Konzentrationen des demethylierenden Agens für die Behandlung eingesetzt wurden. Die Unterschiede in der Anzahl der regulierten *Probe Sets* war im Gegensatz zu EA.hy926 Zellen zwischen den verwendeten Konzentrationen zu vernachlässigen (Tab. 16). Im Vergleich zu EA.hy926 Zellen wurden mehr Transkripte runterreguliert als induziert. Bei der Eingrenzung auf *Probe Sets* der ANGIOGENESE-LISTE von Anders *et al.* wurde dieser Trend ebenfalls festgestellt.

**Tab. 16: Allgemeine Gegenüberstellung der Anzahl der regulierten *Probe Sets* nach globaler Demethylierung mittels 5-Aza-dC in HUVEC Zellen.**

5-Aza-dC	Anzahl der regulierten <i>Probe Sets</i>		Anzahl der regulierten <i>Probe Sets</i> der ANGIOGENESE-LISTE	
	Induktion (FC>2)	Repression (FC<0,5)	Induktion (FC>2)	Repression (FC<0,5)
1,0 µM	8.488 (14,2%)	10.045 (16,8%)	153 (19,2%)	172 (21,6%)
5,0 µM	8.398 (14,0%)	10.530 (17,6%)	156 (19,5%)	209 (23,6%)

Wie für EA.hy926 Zellen bereits durchgeführt, wurde auch für HUVEC Zellen während der bioinformatischen Auswertung nach *Probe Sets* gefiltert, welche einer direkten Konzentrationsabhängigkeit unterlagen. 800 *Probe Sets* wurden als induziert bzw. 1.067 *Probe Sets* als herunterreguliert aus der AGILENT-MICROARRAY Liste identifiziert. Für die ANGIOGENESE-LISTE lagen die Werte bei 71 bzw. 95 *Probe Sets* (Tab. 17).

**Tab. 17: Anzahl der *Probe Sets*, die durch 5-Aza-dC konzentrationsabhängig in HUVEC Zellen reguliert wurden.**

Anzahl induzierten <i>Probe Sets</i> (FC>2)		Anzahl der herunterregulierten <i>Probe Sets</i> (FC<0,5)	
AGILENT MICROARRAY	ANGIOGENESE - LISTE	AGILENT MICROARRAY	ANGIOGENESE - LISTE
800 (1,3%)	71 (8,9%)	1.067 (1,8%)	95 (12,0%)

#### **Expression von *ang-2***

Im Gegensatz zu EA.hy926 Zellen wurde *ang-2* in HUVEC Zellen nur unter 5 µM 5-Aza-dC als differentiell reguliertes Gen mit einer *Fold Change* von 2,18 identifiziert. Bei der geringeren Konzentration lag die Änderung mit 1,93 unter dem Schwellenwert von FC>2 (Abb. 20A). Die *Real-Time* RT-PCR Daten (Abb. 20B), welche eine Expression von 3,13 bzw. 3,47 gegenüber der PBS-Kontrolle zeigten, wiesen wiederum einen Unterschied zu den *Microarray*-Daten im *ang-2* Expressionsniveau auf.

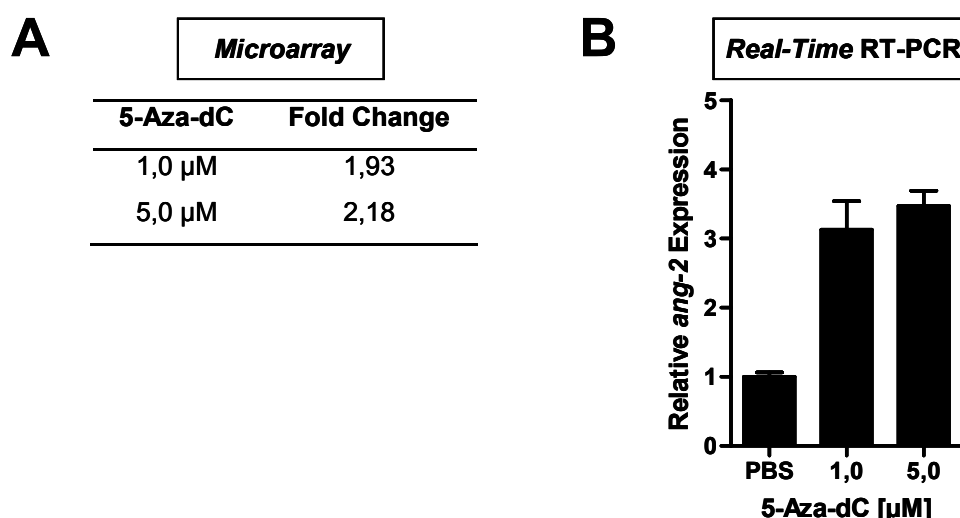


Abb. 20: Vergleich der Daten zur Änderung der *ang-2* Expression aus *Microarray* (A) und quantitativer *Real-Time RT-PCR* (B) in HUVEC Zellen.

### 3.2.3 Vergleich zwischen EA.hy926 und HUVEC

Die Genexpressionsänderungen beider Zelllinien nach Behandlung mit 1,0  $\mu$ M 5-Aza-dC wurden miteinander verglichen (Tab. 18). Insgesamt konnten 2.297 identische *Probe Sets* identifiziert werden, die in EA.hy926 und HUVEC Zellen induziert wurden. Die Anzahl der *Probe Sets*, die eine *Fold Change*  $<0,5$  hatte, lag bei 617. Eine Überprüfung mit den von Anders *et al.* aufgelisteten angiogeneserelevanten Genen, reduzierte die Anzahl der übereinstimmenden Transkripte dramatisch auf 44 bzw. 12. Die Expressionsdaten zur ANGIOGENESE-LISTE sind in Tab. 19 und Tab. 20 (Anhang) dargestellt.

Tab. 18: Anzahl der Gene, deren Expression durch 1  $\mu$ M 5-Aza-dC sowohl in EA.hy926 als auch in HUVEC Zellen differentiell reguliert wurde.

5-Aza-dC	Anzahl induzierten <i>Probe Sets</i> (FC>2)		Anzahl der herunterregulierten <i>Probe Sets</i> (FC<0,5)	
	AGILENT MICROARRAY	ANGIOGENESE - LISTE	AGILENT MICROARRAY	ANGIOGENESE - LISTE
1,0 $\mu$ M	2.297 (3,8%)	23 (2,9%)	617 (1,0%)	6 (0,8%)

#### Auswahl von induzierten Genen

Folgend werden einige ausgewählte Gene betrachtet, deren Expression durch 1  $\mu$ M 5-Aza-dC induziert wurde (FC>2):

EPHRIN B2 (EFNB2) ist ein Marker arterieller Gefäße während der späten embryonalen Entwicklung und in differenzierten Gefäßen. Die Expression ist nicht nur auf das Endothel beschränkt sondern erfolgt auch in glatten Muskelzellen und in Perizyten. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Aktivierung der Angiogenese durch VEGF mit einer erhöhten Expression von *ephrinB2* in

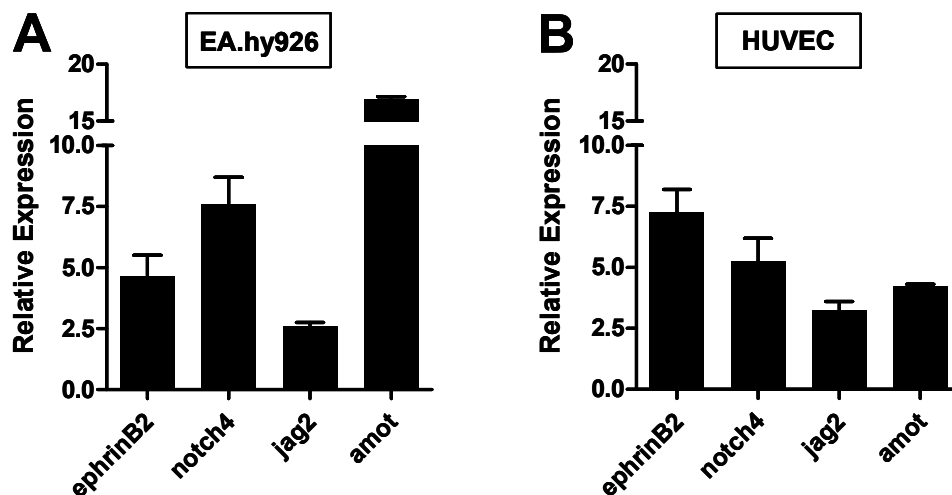
Endothelzellen einhergeht. Durch EphrinB2 wird die Adhäsion, Migration, Chemotaxis und Aussprossung von Kapillaren unterstützt [110].

NOTCH HOMOLOG 4 (NOTCH-4) ist Teil des humanen Notch-Systems, zu dem die transmembranen Rezeptoren Notch-1 bis 4 sowie deren membrangebundenen Liganden gehören. Über den Notch-Signalweg wird das Zellschicksal von Vorläuferzellen diktiert [111] und die Bildung von Gewebsgrenzen festgelegt [112]. Den Zellen werden über den Signalweg Reize zur Proliferation und Apoptose vermittelt, die das Überleben der Zellen gewährleisten [113]. Der Notch-Signalweg spielt anscheinend während des angiogenen Umbaus und bei der arteriovenösen Differenzierung in Endothelzellen eine wichtige Rolle.

JAGGED 2 (JAG2) ist ein Ligand der Notch-Rezeptoren.

ANGIOMOTIN (AMOT) wird primär von Endothelzellen in Kapillaren aber auch in größeren Gefäßen der Plazenta exprimiert und steigert deren Migration in Richtung von Wachstumssignalen. Endothelzellen, die *amot* überexprimieren, erfahren eine Reduktion der gerichteten Migration sowie der Gefäßbildung in Gegenwart von Angiostatin, das die normalen migratorischen Funktionen von Angiomotin unterbindet. Angiomotin wird vorwiegend in der Proliferationszone gefunden [114].

Änderungen der Genexpression der ausgewählten induzierten Gene, die durch *Microarray* detektiert wurden, konnten mittels quantitativer *Real-Time* RT-PCR verifiziert werden. Durch diese Versuche wurden die Änderungen in EA.hy926 und HUVEC Zellen bestätigt. Weiterhin konnte die Validität beider Methoden unabhängig voneinander gezeigt werden (Abb. 21).



**Abb. 21: Transkriptionelle Validierung ausgewählter induzierter Gene (FC>2) mittels *Real-Time* RT-PCR.**

Die Expressionsänderungen aus dem *Microarray* konnten für die ausgewählten Gene mittels *Real-Time* RT-PCR auf mRNA Basis für EA.hy926 (A) Zellen und die primären Endothelzellen HUVEC (B) reproduziert werden. Die relative Expression wurde als x-facher Anstieg im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle dargestellt.



**Auswahl von herunterregulierten Genen**

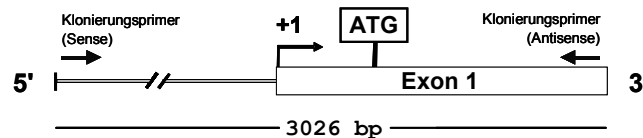
Aus der Gruppe der herunterregulierten Gene ( $FC < 0,5$ ) wurde folgendes Gen ausgewählt:

SPHINGOSINE-1-PHOSPHATE RECEPTOR 2 (*S1PR2*) wird auch als EDG5 (*Endothelial differentiation gene*) bezeichnet und bindet den Liganden Sphingosine-1-Phosphat wodurch dessen vielfältige Funktionen wie Förderung der Proliferation und Migration von Endothelzellen unterdrückt wird [115].

### 3.3 Funktionelle Analyse des *ang-2* Promotors in humanen Endothelzellen

#### 3.3.1 Klonierung des humanen *ang-2* Gens in pGL3 Vektor

Grundlage für Untersuchungen des *ang-2* Promotors war die Klonierung des Promotorbereichs in das Vektorsystem pGL3-Basic. Aufgrund der fehlenden eukaryotischen Promotor- und *Enhancer*-Elemente eignet sich dieser Reportervektor zur Untersuchung von eukaryotischen Promotoren. Hierzu wurde genomische DNA aus AGS Zellen isoliert. Mittels *Primer Walking*, das von der Firma AGOWA GmbH (Berlin) durchgeführt wurde, wurde ein ca. 4 bp großer Bereich des humanen *ang-2* Gens identifiziert. Aus diesem Bereich wurden unter Verwendung von sequenzspezifischen Klonierungsprimern 3026 bp des *ang-2* Gens mittels RT-PCR amplifiziert und über die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *XhoI* und *KpnI* in den Vektor pGL3-Basic kloniert. Die Klonierungsstrategie ist schematisch in Abb. 22 dargestellt. Durch Sequenzierung wurde die Spezifität der klonierten *ang-2* Sequenz (Abb. 24) nachgewiesen.



**Abb. 22: Klonierung des humanen *ang-2* Gens.**

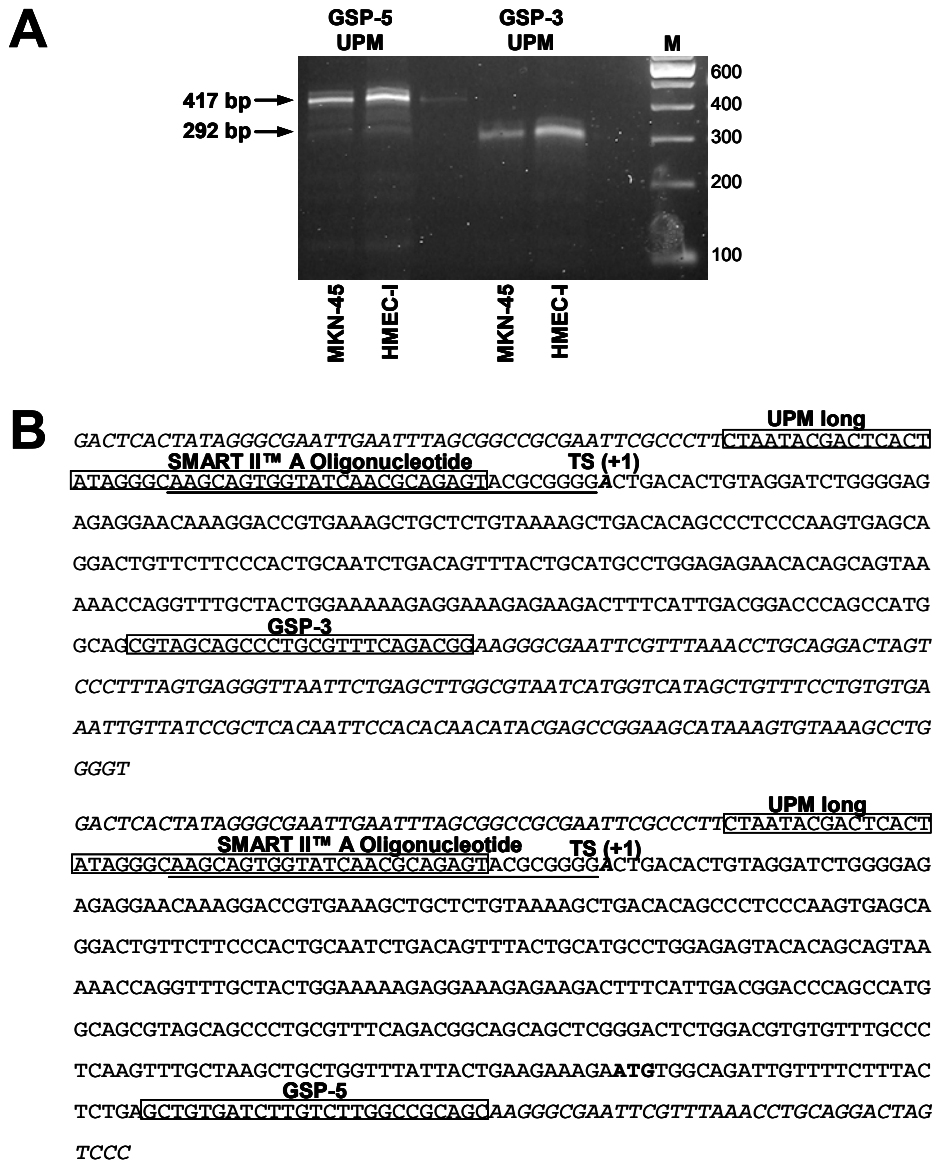
Strategie zur Amplifikation und Klonierung eines ca. 3kb großen Bereichs des *ang-2* Gens (-2702/+324) mittels Klonierungsprimern als Grundlage für die Promotoranalyse.

Für die folgenden Promotoruntersuchungen war es von essentieller Bedeutung von einem einheitlichen Transkriptionsstartpunkt (TS) auszugehen. Da in der Literatur verschiedene Transkriptionsstartpunkte publiziert worden sind, wurde die erste transkribierte Base mittels 5'-RACE (*Rapid Amplification of cDNA-Ends*) genau bestimmt (Abb. 23). In der vorliegenden Arbeit sind alle weiteren Nummerierungen des *ang-2* Gens relativ zu dem von uns mit +1 markierten Transkriptionsstartpunkt zusehen.

Nach cDNA Synthese mit dem SMART<sup>TM</sup> RACE *cDNA Amplification Kit* (Clontech, USA) aus Gesamt-RNA von MKN-45 und HMEC-I Zellen erfolgte die 5'-RACE-PCR. Zur Amplifikation der unbekannten Region stromabwärts vom Codon ATG wurden zwei genspezifische Primer (GSP), die im Exon 1 binden, verwendet. GSP-3 ist innerhalb der bekannten 5'-UTR (untranslatierte Region) 72 bp stromaufwärts von ATG lokalisiert. Der Primer GSP-5 bindet dagegen im translatierten Bereich 50 bp stromabwärts von Codon ATG. Mit dem *Universal Primer Mix* (UPM) und den genspezifischen Primern, wurden zwei unterschiedlich große Sequenzen amplifiziert. Das Ergebnis der Gelelektrophorese der 5'-RACE-Produkte ist in Abb. 23A gezeigt. Die 292 bp große Bande ist auf die Kombination von UPM und GSP-3 zurückzuführen. Dagegen lief das PCR-Produkt mit UPM und GSP-5 auf einer Höhe von 417 bp.

Um den Transkriptionsstartpunkt genau bestimmen zu können, wurden die PCR-Produkte mittels des TOPO TA *Cloning*<sup>®</sup> *Kits* (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) in den Vektor pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup> subkloniert und in

Bakterien transformiert. Positive Klone konnten durch den Verdau mit dem Restriktionsenzym *NcoI* identifiziert werden. Das Ergebnis der Sequenzierung von zwei positiven Klonen ist beispielhaft in Abb. 23B dargestellt. Basierend auf diesen Daten wurde der Transkriptionsstartpunkt 312 bp stromaufwärts vom Startcodon ATG gelegen identifiziert.



**Abb. 23: Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts in MKN-45 und HMEC-I Zellen mittels 5'-RACE.**

A) Gelelektrophoresebild der 5'-RACE-PCR Produkte. B) Darstellung von Sequenzierungen positiver Klone. In den Sequenzen ist die Lage der genspezifischen Primer (GSP-3 bzw. 5), des universellen Primers (UPM) sowie der SMART-Oligos gekennzeichnet. Aufgrund der Größe der spezifischen 5'-RACE-Produkte wurde der Transkriptionsstartpunkt 312 bp stromaufwärts vom Startcodon ATG gelegen identifiziert. Die Basen des Sequenzierungsvektors sind *kursiv* dargestellt. M - DNA-Marker

-2702 **-2702** TCTCTGGTTCGATAATTTCCA -2681  
 -2680 TTTAGGAATCTACAAAGAGCTGTTCTCTCCATGTTTCGGAACCTTGAGGGAATTTGAAAAGGATGGAGTCCA -2611  
 -2610 TGCCAGCTGCACATGGCATATTGTGCACCCGGAAGCATCACTGTCTTTCTTTGTGCTCCGACTGCTCTCT -2541  
 -2540 CTTACCACATCCAATTTGTTTATGGGTCTCTCCCTCTCCATACACTATTAGCTTCTTTAGGTCAGACACC -2471  
 -2470 CAGTTGCCCTTAATCTCTATCCCCAGTGCATAGCATGGTGTCTGACACAAGGCTGGTAGACAAAAAGTACT -2401  
 -2400 GTGGTGTGCCCTCTTTCTATTGTTCCCTTTTAACTACTCTATTGCTGGAAGACAACCTGAATGACTTT -2331  
 -2330 TAAACCATATATGCAGGCCAGGTACAGTGGCTCACACCTGTGATCCAGCACTTTGGGAGGCCAAGCAA -2261  
 -2260 GAGGATCATTGGATGCCAGGAGTTCAAGACCAGCCTGGGCAACAAGAGTGAGACCCCGTCTCTACAAAAA -2191  
 -2190 ATAATCTTGAAAAAGGTAAAACCATATGTGATATTAATACCTTACAATATGCTTTTCAAACAGGAA -2121  
 -2120 ATAAAAAATGTACCCTATGCCACTGCCACTGCTTTGCATTAGAGAAATAGCAGAGTTATACTATTTTGA -2051  
 -2050 TGGTGAAGAAGTATCCCATTTAATGGAGCATGCCTGTAAAGAAAAGGAACAAATATTCTAAACATA -1981  
 -1980 CAATTATATCTTAATCCTAAAAACCTACAGAGAAAAATGATCTCCATCTTATGACTAGGGAGACTGAG -1911  
 -1910 GCTCCAAGAAATGGAAGCATTGCTGGAGGTACACAGAAAGCAGGTTCTAACACAGGTCTCATCTTTAAG -1841  
 -1840 ACCTATATGCTTTCTCGACGGTGCACTGTCCGGATGGGTATAGCATCTTTAATTGGTTCCTTAGTGGA -1771  
 -1770 AACCATGTCCAGAACCTTGGTGAATCATACTACCTCTTCTACTAATGAGATCCTTCCAGAGCATGCTTT -1701  
 -1700 CCAGCTTTTCTGTGTGACAGAACCCCTTTGGTTGTCTGGTGAAGCCTATAAACACCTTCTCAAAGAAGAC -1631  
 -1630 ACATGCTACTTTATTTCAATGTTTCAGTAGCAAGATCTAGGGCTGGGTTTAATAAAAAATGATGTTCTGAGT -1561  
 -1560 ATTGTGGCAGCAATAAAAAAGAGCTGATTTCTGAGGATGAGAAAGTCACAGATATTCACACTGTTGTTTCG -1491  
 -1490 TTAATCTTCAATTGATAAGGGAAGGCTGTCTTCGGTTAGAGCTTAGTAAAAAATAAGATCTTTTATG -1421  
 -1420 GGTAGATGTGTCTGTTAAGTCAGTGTACCAGCTATTAGCGCTCACTGGGAATAATAAACCTTGTACCT -1351  
 -1350 TGAGAGATAAACCGCAGCAAGGCGAGGGGCTTTTCCCTATGTACACTTGGGCTGTGAGTTAACATAT -1281  
 -1280 TATTAATCTCTGAAGTATTAAGTTTGTAGTTGTTAAAGGAAGTGACTTGCAGAACTTACAGAGCCATAGGA -1211  
 -1210 TTGAAGGTGAAAAATCTTGAGTGCACCCCTTGAATTGCACAGATGAGGACATTAGAGCTTAATTAATA -1141  
 -1140 CAGGGAGTGACTTGCCCGAGTCTAATACCAAGGGGACTAATGTAATTGATAATGTGTTACAAAAATGCT -1071  
 -1070 GAGATGTCAACAAATCTGACACAATAAAGAAGTTTGTGGGCCAGGCATGGTGACTCACACCTGTAATCT -1001  
 -1000 CAGCACTTTGGGAGGCCAAAGGCGAGTCGATCACAGGTCATGAGTTTGAGACCAGCCTAACATGGTGAA -931  
 -930 ACCCTGTCTCTACTAAAAATACAAAAATTAGCCGGGTGTGGTGGCGTTTGCTGTAAATCCAGCTGTCTCA -861  
 -860 GGAGCCTGAGGCAAGAGAATCACTTGAAACCCGGAAGGCGGAGGTTGCAGTGAGCCAACATTGCCCCACTG -791  
 -790 CACTCTAGCCTGGTCGACAGAGCGAGACTCCCGTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTTGTATTCC -721  
 -720 TCTTTCTACACAGGCACTTAAATCTAATTTCTCTATTGTAATGTAATGAACCTTAATCAGTACAGTGTAT -651  
 -650 TTTTAGAGTGAATATCCAAGTGGAGTTTAAAGAATAAAGGTGAGAGCTCAGAACTGATGTTTCTA -581  
 -580 ACGTGACTTAATAACAGATCTTTCTATCAACTGTTTCGAAATGAAAATCTTTGTAACCTGGCTAGTGG -511  
 -510 TTCAAGAATCAACTAAATCAATGAATCTATTTTCCCTCTGAAAAGGCACACGTTTACAGGAGCCAAAC -441  
 -440 TTCTTCTCTTTATTGTAATAACAAAAATAAACCGAAGTCTGACCTATTGTAATATTTTATTCTTA -371  
 -370 AAGGAAAAACAGGAACCTTTCATTGTACTTCAACATTAAAGTTATTACCTCAGATATTTGCCAGCTTAG -301  
 -300 CACGGCAAAAATCAGTTTCAGACAAAAGAGATCAACTGCTCTCTCTAGGAAATACTTAATTGGGGTGGTG -231  
 -230 CCTAGGAAATGCCAGGGTCTGTAAACAGATCGGTTTTCAGAGGTTTCTGCAGCATGGGTCTCTGG -161  
 -160 TTGGAGGCGAGGCACTTCTGCTCTGATTTTCTGTGCTGGCTAGTGACCCCTACAGGAAGATAACGG -91  
 -90 CTAAGCCAGGAGGGCGAGCAGCCACTACACATGTCTGGCTGCTCTTATCACTTATCATATAAGGAAA -21  
 -20 GGAAAGTGATTGATTCGGATCTGACACTGTAGGATCTGGGGAGAGAGGAACAAAGGACCGTGAAAGCTG +50  
 +51 CTCTGTAAAAGCTGACACAGCCCTCCCAAGTGAGCAGGACTGTTCTCCCACTGCAATCTGACAGTTTAC +120  
 +121 TGCATGCTTGAGAGAACACAGCAGTAAAAACAGGTTTGCTACTGGAAAAAGAGAAAGAGAAAGACTTT +190  
 +191 CATTGACGGACCCAGCCATGGCAGCGTAGCAGCCCTGCGTTTTCAGACGGCAGCAGCTCGGACTCTGGAC +260  
 +261 GTGTGTTTGCCCTCAAGTTTGCTAAGCTGCTGGTTTATTACTGAAGAAAGAAATGTGGCAGATTG +324

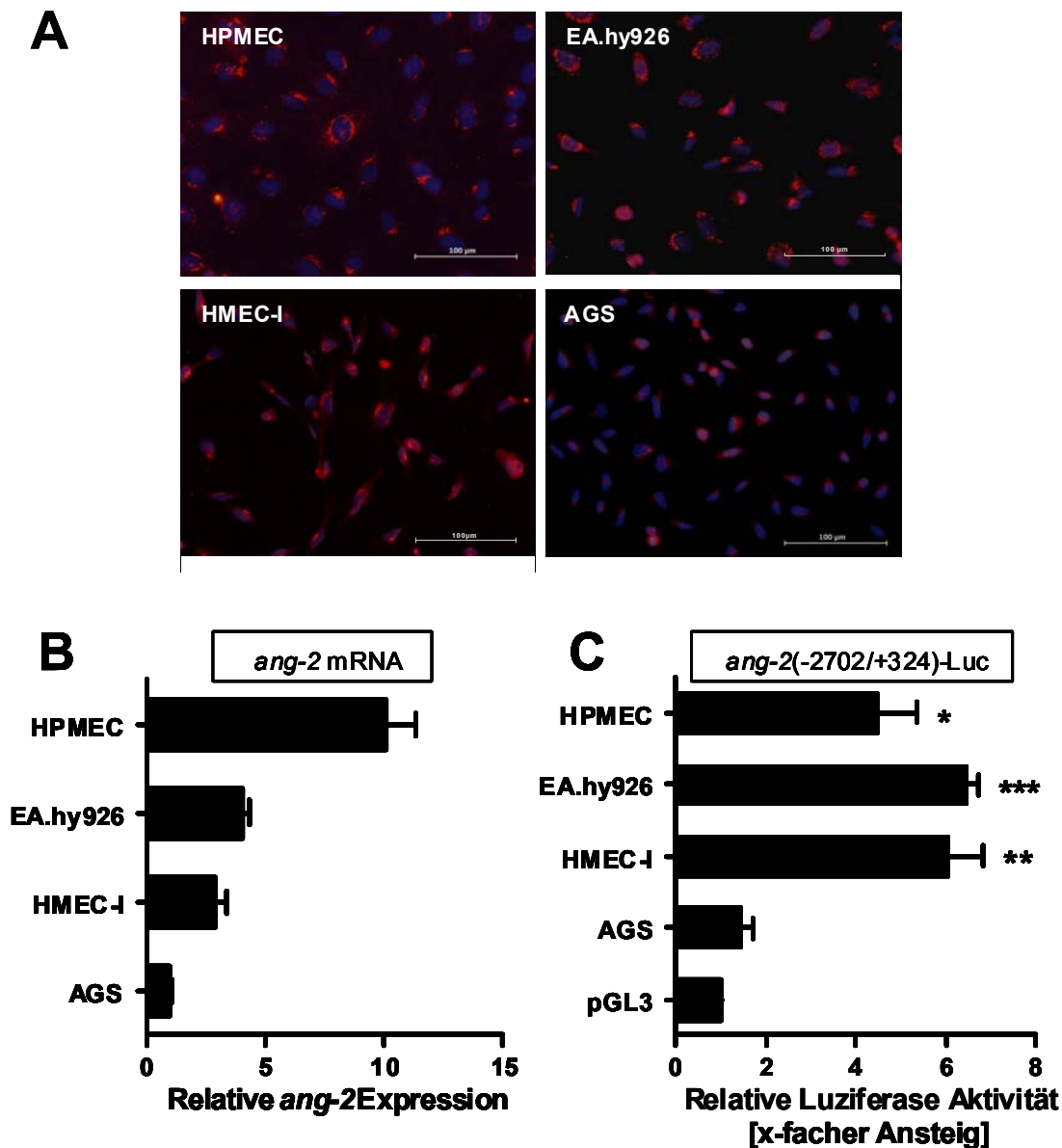
**Abb. 24: Sequenz der 5'-flankierenden Region des humanen *ang-2* Gens.**

Die Nukleinsäuresequenz -2702/+324 des *ang-2* Gens ist bezüglich dem unter 3.3.1 identifizierten Transkriptionsstart dargestellt. In der Deletionsanalyse verwendete Primer sind durch Pfeile gekennzeichnet.

### 3.3.2 Bestimmung der Lokalisation von Ang-2 und der relativen Menge der *ang-2* Expression in verschiedenen Endothelzelllinien

Die subzelluläre Lokalisation von Ang-2 Molekülen wurde in einer Immunfluoreszenzuntersuchung mit spezifischem polyklonalem Antiserum gegen Ang-2 durchgeführt. Die Endothelzelllinien (HPMEC, EA.hy926 und HMEC-I) zeigten ein ähnliches Verteilungsmuster. Zytoplasmatisch waren perinukleär vesikuläre Strukturen immunopositiv, wobei die stärkste Expression von Ang-2 in den EA.hy926 Zellen detektiert werden konnte. In den als Kontrollzellen dienenden AGS Zellen konnte keine spezifische Anfärbung gefunden werden (Abb. 25A).

Des Weiteren wurden mit Hilfe der *Real-Time* RT-PCR die relativen mRNA-Mengen von *ang-2* in den untersuchten Zellen bestimmt. Aus Vorversuchen war bekannt, dass AGS Zellen im Vergleich zu Endothelzellen geringere *ang-2* Expressionen aufweisen (Abb. 25B). Die Expressionsrate für *ang-2* lag in den drei Endothelzelllinien (HPMEC, EA.hy926 und HMEC-I) 3- bis 10-mal über dem Wert der für die AGS Epithelzellen ermittelt werden konnte.



**Abb. 25: Expression und Promotoraktivität von *ang-2* in Endothelzelllinien.**

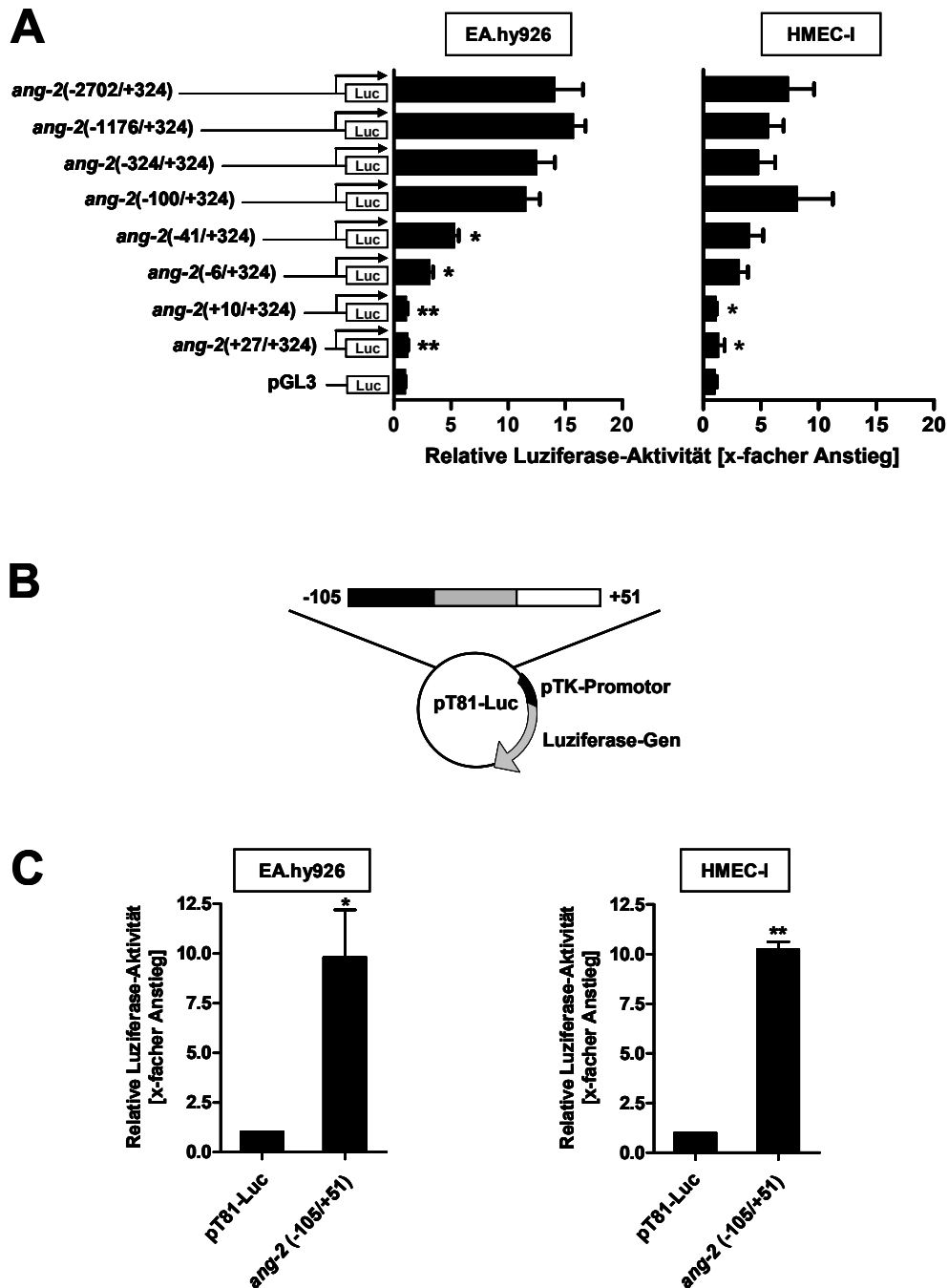
A) Nachweis von Ang-2 in den humanen Endothelzelllinien HPMEC, EA.hy926 und HMEC-I sowie in der Magenkarzinomzelllinie AGS durch Immunfluoreszenzmarkierung mit Antikörper gegen Ang-2 (rot). Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt (blau). B) Quantitative Bestimmung der *ang-2* mRNA in Endothelzellen und der Magenkarzinomzelllinie AGS mittels *Real-Time* RT-PCR. In Endothelzellen war die Expression insgesamt höher als in der epithelialen Referenzzelllinie AGS. Vor allem die Primärzellen HUVEC zeigten eine sehr hohe Expression. C) Die Zelllinien HPMEC, EA.hy926, HMEC-I und AGS wurden transient mit dem *ang-2* Promotorkonstrukt *ang-2*(-2702/+324)-Luc transfiziert. Innerhalb der Gruppe der Endothelzelllinien gab es keine gravierenden Unterschiede in der Promotoraktivität von *ang-2*, sie war aber um ein 2,5 bis 3-faches höher als die Aktivität in AGS Zellen. Die Luciferase-Aktivität des Konstrukts ist als x-facher Anstieg im Vergleich zur Aktivität des Leervektors pGL3 dargestellt. Signifikanzen wurden mittels Student's t-Test berechnet (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

### 3.3.3 Promotoraktivität von *ang-2* in Endothelzelllinien

In einem Vorversuch wurde das Reportergenkonstrukt *ang-2*(-2702/+324) in HPMEC, EA.hy926, HMEC-I sowie in AGS Zellen transient transfiziert (Abb. 25C). Die Expressionskontrolle dieses 5'-flankierenden Bereichs des Promotors wurde in einem Luziferase-Assay bestimmt. Als Kontrollzellen dienten hier die entsprechenden, mit dem Leervektor transfizierten Zellen. Die Untersuchungen ergaben, dass in den Endothelzellen der *ang-2* Promotor durch die Transaktivierung einem 4,5 bis 6,5-fachen Anstieg der *ang-2* Expression zeigten. Die AGS-Zellen wiesen hingegen nur einen 1,5-fachen Anstieg auf. Diese Daten decken sich mit den Ergebnissen aus den Expressionsuntersuchungen mittels quantitativer *Real-Time* RT-PCR (Abb. 25B). Aufgrund dieser Daten wurden die Zelllinien EA.hy926 und HMEC-I für weitere Untersuchungen zum *ang-2* Promotor ausgewählt.

### 3.3.4 Identifizierung regulatorischer *ang-2* Promotorbereiche

Das Aktivierungspotential des klonierten *ang-2* Promotorabschnitts in Endothelzellen konnte bereits unter Punkt 3.3.3 gezeigt werden. Im nächsten Schritt erfolgte eine weitere Eingrenzung des essentiellen Promotorbereichs durch eine 5'-Deletionsanalyse (Abb. 26A). Mit Hilfe von spezifischen Primern wurden Promotorfragmente mittels RT-PCR amplifiziert, die auf einer sukzessiven Verkürzung ausgehend vom 5'-Ende basierten. Die Lage der verwendeten Primer in der *ang-2* Sequenz ist in Abb. 24 durch Pfeile gekennzeichnet. Die amplifizierten Promotorfragmente wurden in den Vektor pGL3 subkloniert und durch transiente Transfektionen in die Zellen EA.hy926 und HMEC-I eingeführt. Die Ergebnisse der 5'-Deletionsanalyse sind in Abb. 26A dargestellt. In EA.hy926 Zellen konnte nach Verkürzung der Promotorsequenz von Position -2702 bis -100 kein wesentlicher Abfall in der Promotoraktivierung festgestellt werden. Durch Verkürzung von *ang-2*(-100/+324) um weitere 60 bp vom 5'-Ende sank die transkriptionelle Aktivität im Konstrukt *ang-2*(-41/+324) jedoch signifikant um mehr als 60% im Vergleich zur Kontrolle *ang-2*(-2702/+324). Der Verlust von weiteren 50 bp führte im Konstrukt *ang-2*(+10/+324) zu einer vollständigen Aufhebung der Promotoraktivität. In der zweiten untersuchten Zelllinie HMEC-I war ebenfalls ein Abfall der Promotoraktivität erst nach Deletion der 5'-Sequenz bis zum Konstrukt *ang-2*(-41/+324) zu erkennen. Im Bereich der Sequenz -2702 bis -100 zeigte sich hingegen eine Schwankung der Promotoraktivität. Für das Konstrukt *ang-2*(-41/+324) konnte jedoch eine eindeutige fast 50%ige Reduktion der Transkription gemessen werden. Wie bereits in EA.hy926 Zellen beschrieben wurde, fiel die Promotoraktivität in den HMEC-I Zellen nach Transfektion von *ang-2*(+10/+324) auch auf das Niveau des Leervektors pGL3 ( $p < 0,05$ ). Die an den Endothelzelllinien EA.hy926 HMEC-I durchgeführte Deletionsanalyse zeigte somit, dass die zur Aufrechterhaltung der *ang-2* Promotoraktivität notwendigen regulatorischen Elemente in einem Bereich von -100 bis +10 vermutet werden können.



**Abb. 26: Bestimmung des essentiellen *ang-2* Promotorbereichs.**

A) 5'-Deletionsanalyse des *ang-2* Promotors. Die Endothelzelllinien EA.hy926 und HMEC-I wurden transient mit einer Reihe von 5'-Deletionskonstrukten des humanen *ang-2* Promotors transfiziert. Die relative Luciferase-Aktivität ist als x-facher Anstieg im Vergleich zum Leervektor pGL3 dargestellt. Die für die einzelnen Konstrukte ermittelten Luciferase-Werte wurden mit dem des jeweils längsten Konstrukts verglichen und statistisch durch Student's t-Tests ausgewertet. B) Subklonierung des regulatorischen Minimalpromotorelements in ein heterologes Promotorsystem. Die Sequenz *ang-2*(-105/+51) wurde in das Plasmid pT81-Luc kloniert. C) Durch transiente Transfektion in EA.hy926 und HMEC-I wurde ein signifikanter Anstieg der relativen Transaktivierung von *ang-2*(-105/+51) im Vergleich zum Leervektor pT81-Luc erreicht. Signifikanzen wurden mittels Student's t-Test berechnet (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ).

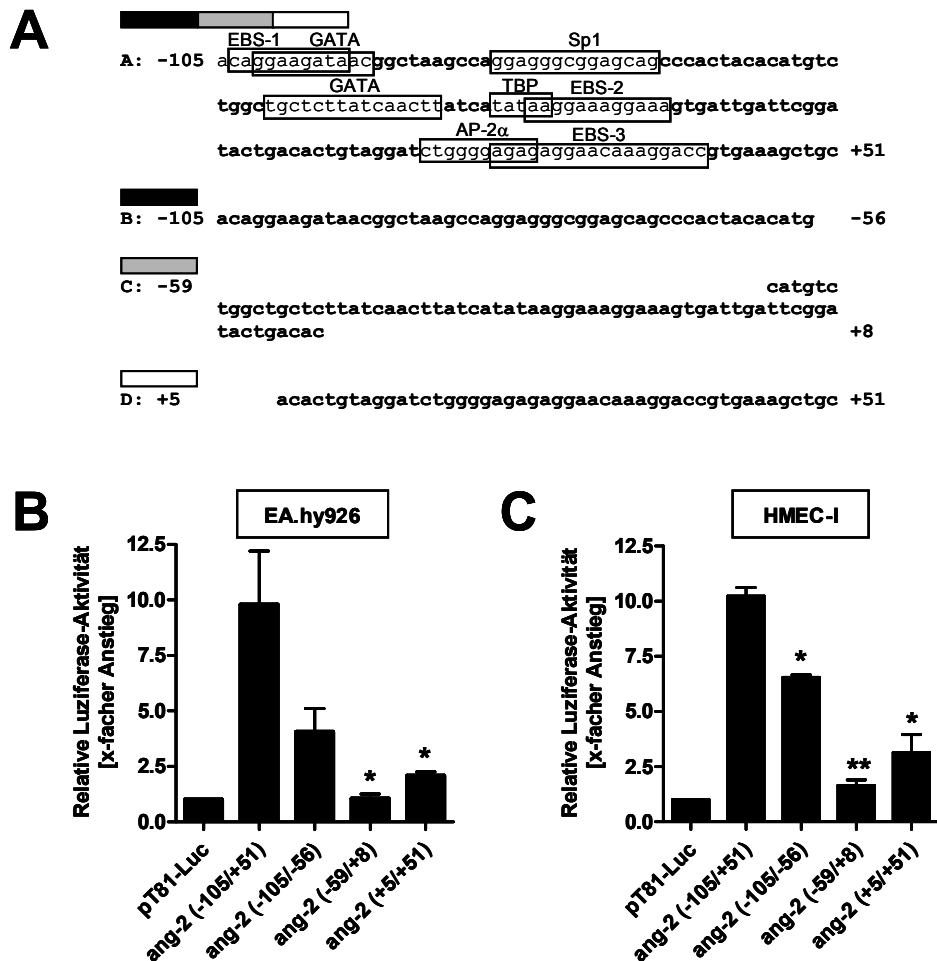
Bisher konnte gezeigt werden, dass durch Klonierung des *ang-2* Promotors in das Vektorsystem pGL3 eine Promotoraktivierung auftritt. Jedoch wurde nicht geklärt, ob der definierte Promotorbereich *per se*



als *Enhancer* wirken kann. Um dieser Frage nachzugehen, wurden der Bereich von -105 bis +51, der somit 41 bp über die Position +10 hinaus stromabwärts enthält, in das Vektorsystem pT81-Luc umkloniert. Durch die über den identifizierten Bereich -105 bis +10 hinausgehende Ausweitung sollte verhindert werden, dass wichtige Funktionen oder Elemente verloren gehen. Den mit diesem Vektorsystem generierten Konstrukten wurde dem Luziferasereporter der *Enhancer*-lose Thymidinkinase-Promotor (pTK) vorgeschaltet (Abb. 26B). Nach Transfektion der neuen Plasmide in EA.hy926 und HMEC-I Zellen konnte eine 9- bis 10-fache Änderung und somit ein signifikanter Anstieg der relativen Luziferase-Aktivität gegenüber der Kontrolle pT81-Luc gemessen werden (Abb. 26C). Da der Vektor pT81-Luc selbst kein *Enhancer*-Element enthält, weist dieses Ergebnis daraufhin, dass die identifizierte *ang-2* Promotorregion eine *Enhancer*-Funktion für das humane *ang-2* Gen ausübt. Der Sequenzbereich -105 bis +51 war somit als essentiell und ausreichend für die basale Promotoraktivität des *ang-2* bestimmt worden.

Der identifizierte essentielle Promotorbereich *ang-2*(-105/+51) wurde mit Hilfe von Datenbanken (*AliBaba2.1* und *MatInspector* Software) nach potentiellen Bindungsstellen für transaktivierende Proteine, den Transkriptionsfaktoren durchsucht. Es konnten mögliche Bindungsmotive für regulatorische Proteine der Sp-Familie, der ETS-Familie (EBS-1 bis 3, *Ets binding site*) und Faktoren der GATA-Familie sowie AP-2 $\alpha$  lokalisiert werden. Deren Lage wurde schematisch in Abb. 27A innerhalb der Sonde A gekennzeichnet. Weiterhin konnte ein potentielles Bindungsmotiv für TBP (*TATA-binding protein*) und somit eine mögliche TATA-Box im *ang-2* Promotor identifiziert werden. In weiteren Untersuchungen sollten im Bereich des Minimalpromotors *ang-2*(-105/+51) Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren identifiziert werden.

Auf Grundlage der potentiellen Bindungsstellen wurde das Gesamtkonstrukt (Sonde A, -105/+51) zur weiteren Eingrenzung in drei Fragmente geteilt, die als Sonden B (-105/-56), C (-59/+8) und D (+5/+51) bezeichnet wurden (Abb. 27A). Eine erste Untersuchung der Teilfragmente des Minimalpromotors fand nach Subklonierung in das heterologe Promotorsystem des Vektors pT81-Luc in EA.hy926 (Abb. 27B) sowie in HMEC-I Zellen (Abb. 27C) statt. Durch transiente Transfektionen und Messung der Luziferase-Aktivität konnte den Fragmenten unterschiedlich starke Aktivierungspotentiale zugewiesen werden. Der Minimalpromotor *ang-2*(-105/+51) führte in beiden endothelialen Zelllinien zu einem signifikanten Anstieg der Luziferase-Aktivität gegenüber dem Leervektor pT81-Luc. Durch die Teilung der Sequenz fiel die Aktivität in den Teilfragmenten gegenüber dem Gesamtkonstrukt deutlich ab. In EA.hy926 Zellen wies das Konstrukt *ang-2*(-105/-56) nur ca. 45% der Gesamtaktivität auf; im Konstrukt *ang-2*(+5/+51) sank sie auf 22% ( $p < 0,05$ ). Diese beiden Konstrukte zeigten in HMEC-I Zellen ebenfalls eine deutlich reduzierte Aktivität gegenüber *ang-2*(-105/+51), diese war jedoch mit 63% ( $p < 0,05$ ) bzw. 30% ( $p < 0,05$ ) höher als in EA.hy926 Zellen. Die Luziferase-Aktivität des Teilfragments C [*ang-2*(-59/+8)] lag in beiden Zelllinien auf Höhe des Leervektors pT81-Luc. Für die basale *ang-2* Promotoraktivität schienen somit vor allem die Bereiche der Konstrukte B (-105/-56) und D (+5/+51) ausschlaggebend zu sein. Die gemessene Transaktivierung durch diese Konstrukte fiel jedoch deutlich geringer als für das Gesamtkonstrukt (-150/+51) beschrieben aus. Beide Sequenzbereiche scheinen über Teilaktivitäten zu verfügen, die im Zusammenspiel dem des Gesamtkonstrukts entsprechen. Innerhalb dieser Bereiche befinden sich putative Bindungsmotive für Transkriptionsfaktoren der Sp-Familie, AP-2 $\alpha$  sowie für ETS-Proteine (Abb. 27A).



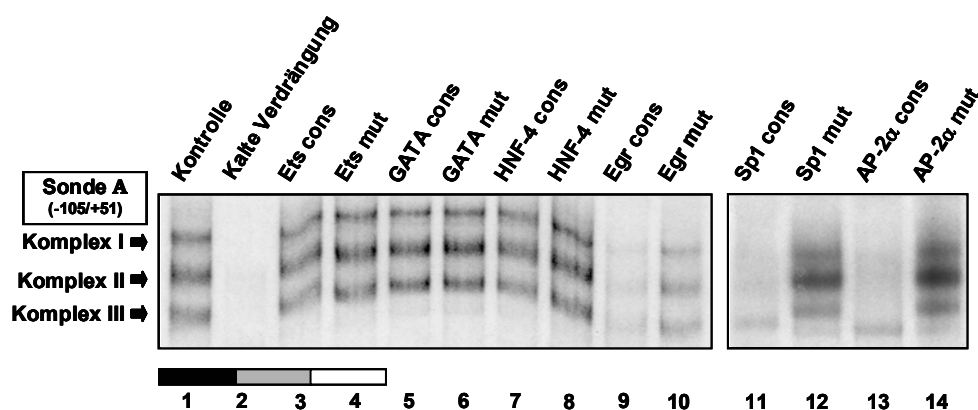
**Abb. 27: Untersuchung von Teilbereichen des Minimalpromotors *ang-2*(-105/+51).**

A) Die Sequenz von *ang-2*(-105/+51) des für die Regulation der *ang-2*-Basalaktivität als ausreichend und notwendig identifizierten Minimalbereichs und deren Fragmente B, C und D sind dargestellt. Die Sonden kamen sowohl in Transfektions- als auch in EMSA-Studien in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz. In der Sonde A sind mögliche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren angegeben. Nach Klonierung der Teilkonstrukte in den Vektor pT81 wurden diese in Transfektionsstudien in EA.hy926 (B) und HMEC-I Zellen (C) verwendet und hinsichtlich ihrer Luziferase-Aktivität ausgewertet. Die Teilkonstrukte wurden als x-facher Anstieg in Bezug auf den Leervektor pT81-Luc dargestellt. Die relative Luziferase-Aktivität der Teilkonstrukte war im Vergleich zu *ang-2*(-105/+51) stark reduziert. Signifikanzen wurden mittels Student's t-Test ins Verhältnis zu *ang-2*(-105/+51) berechnet (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ).

### 3.3.5 Regulation des *ang-2* Promotors durch Sp-Transkriptionsfaktoren

Nach Eingrenzung der essentiellen basalen Promotorsequenz *ang-2*(-105/+51) erfolgte eine Untersuchung der an diese Elemente bindenden Transkriptionsfaktoren durch *Electrophoretic Mobility Shift* Assays (EMSA). Hierfür wurden Ang-2-Oligonukleotide mit [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP radioaktiv markiert und mit nukleären Proteinen inkubiert, die zuvor aus Endothelzellen präpariert wurden. Die molekulare Identität der an diese Genregionen bindenden transaktivierenden Proteine sollte anschließend in Verdrängungsexperimenten sowie durch *Supershift*-Analysen unter Einsatz von Antikörpern untersucht werden, die spezifisch gegen bekannte Transkriptionsfaktoren gerichtet sind.

Um zu klären, welche regulatorischen Proteine an den Bereich des Minimalpromotors (-105/+51) binden, wurde die Sonde A radioaktiv markiert und mit nukleären Proteinextrakten aus HMEC-I Zellen in Verdrängungs- und *Supershift*-Analysen eingesetzt. Zunächst wurde in Verdrängungsstudien das Bindungspotential verschiedener Transkriptionsfaktoren gegenüber der Sonde A (-105/+51) untersucht (Abb. 28). Nach Inkubation von Kernextrakten mit der Sonde A bildeten sich drei spezifische DNA-Protein-Komplexe aus (Bahn 1). Diese wurden durch die nicht-markierte Sonde, die im 100-fachem molaren Überschuss eingesetzt wurde, vollständig verdrängt (Bahn 2). Zur Charakterisierung der bindenden Proteine wurden Verdrängungsstudien mit Oligonukleotiden in 100-fachem molaren Überschuss durchgeführt, die den Consensus-Bindungssequenzen der verschiedenen Faktoren entsprachen. Für die Transkriptionsfaktoren Ets, GATA und HNF-4 konnte keine Verdrängung durch Consensus-Oligonukleotiden beobachtet werden (Bahnen 2 bis 8). Der Einsatz von Egr cons resultierte in eine Abschwächung der drei Komplexe (Bahn 9). Jedoch waren auch die gebildeten Komplexe in Gegenwart der mutierten Oligonukleotide schwächer als in der Kontrolle (Bahn 10). Der Einsatz von Sp1 Consensus-Oligonukleotiden führte zur Verdrängung der Komplexe I bis III (Bahn 11). Die Spezifität dieser Verdrängung konnte durch die Verwendung von Oligonukleotiden mit einer mutierten Sp1-Bindungssequenz bestätigt werden. Durch den Einsatz dieser Oligonukleotide blieben die drei DNA-Protein-Komplexe erhalten (Bahn 12). Ein ähnliches Bild wurde durch Oligonukleotide spezifisch für AP-2 $\alpha$  beobachtet (Bahnen 13 und 14).

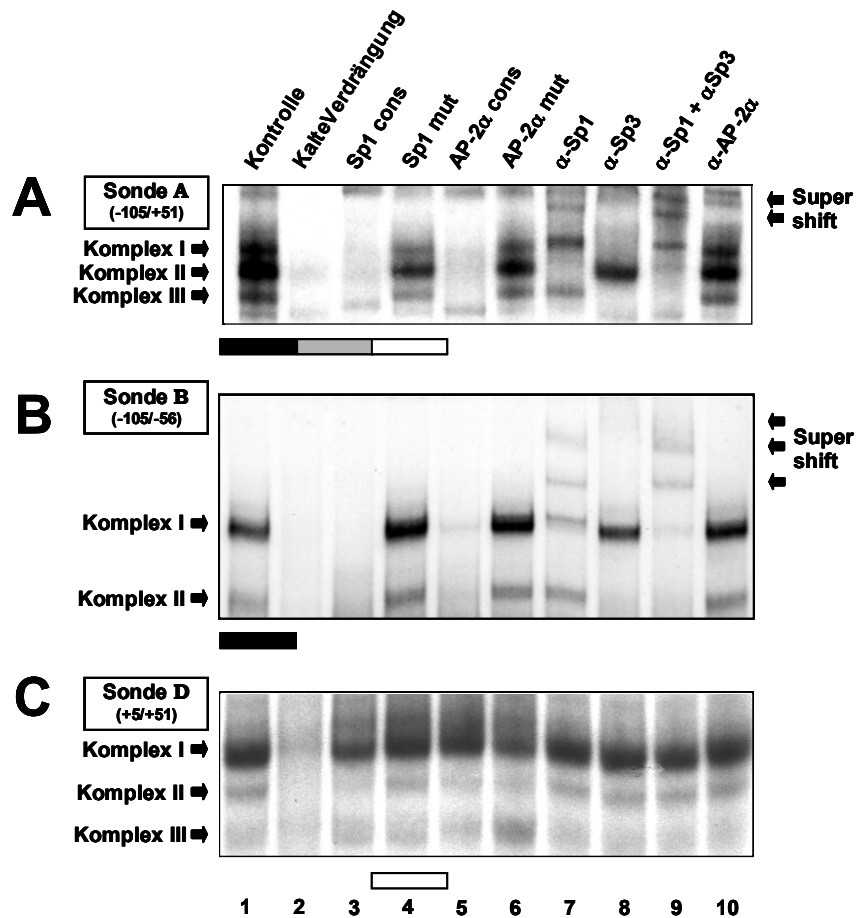


**Abb. 28: Untersuchung potentieller Transkriptionsfaktoren auf ihre Bindung an die Sonde A [ang-2(-105/+51)] mittels Kompetitionsstudien.**

Für die Versuche wurden Kernextrakte aus HMEC-I Zellen isoliert und mit der  $^{32}\text{P}$ -radioaktiv markierten *ang-2* Sonde A inkubiert. Nicht-markierte consensus bzw. mutierte Oligonukleotide für verschiedene Transkriptionsfaktoren (Ets, GATA, HNF-4, Egr, Sp1 und AP-2 $\alpha$ ) wurden im 100-fachen molaren Überschuss zur Verdrängung zugegeben. Durch die Verdrängungsstudien wurden die Faktoren Sp1 und AP-2 $\alpha$  als potentielle Proteine identifiziert, die an die *ang-2* Sequenz (-105/+51) binden (Bahn 11 bis 14). Die Ansätze wurden in einem nativen TBE-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die DNA-Protein-Komplexe sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Aufgrund des Bindungsverhaltens von Sp1 und AP-2 $\alpha$  gegenüber der Gesamt-Sonde A wurden diese Transkriptionsfaktoren näher untersucht. Zusätzlich wurden die Sonden B und D verwendet (Abb. 29). Diese beiden Teilbereiche des *ang-2* Minimalpromotors waren im heterologen Promotorsystem als essentiell für die Promotoraktivität identifiziert worden (Abb. 27B und C). Für die Sonde B und D

wurden durch Verdrängung mittels nicht-markierter Sonden zwei (Abb. 29B, Bahn 1/2) bzw. drei (Abb. 29C, Bahn 1/2) charakteristische DNA-Protein-Komplexe identifiziert.



**Abb. 29: Bindung der Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 an den regulatorischen Minimalpromotorbereich.**

Zur Bestimmung von Transkriptionsfaktoren, die an den identifizierten Minimalpromotorbereich binden, wurden Kompetitions- (Bahnen 1-6) und Supershift-Studien (Bahnen 7-10) mit nukleären Proteinen und den Sonden A (-105/+51), B (-105/-56) und D (+5/+51) des *ang-2* Promotors durchgeführt. Für die Versuche wurden Kernextrakte aus HMEC-I Zellen isoliert und mit den  $^{32}\text{P}$ -radioaktiv markierten *ang-2* Sonden inkubiert. Nicht-markierte consensus bzw. mutierte Oligonukleotide für Sp1 oder AP-2 $\alpha$  wurden im 100-fachen molaren Überschuss zur Verdrängung zugegeben. In den *Supershift*-Untersuchungen wurden spezifische Antikörper gegen Sp1, Sp3 oder AP-2 $\alpha$  zum Ansatz gegeben. Die Ansätze wurden in einem nativen TBE-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die DNA-Protein-Komplexe und *Supershifts* sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Zur Verifizierung der Ergebnisse aus Verdrängungsstudien (Abb. 28) und Identifikation der Proteinkomplexe kamen spezifische Antikörper gegen Sp1, Sp3 und AP-2 $\alpha$  in *Supershift*-Analysen mit Sonde A zum Einsatz (Abb. 29A). Durch einen spezifischen Antikörper gegen Sp1 ( $\alpha$ -Sp1) wurde ein *Supershift* des Komplexes II beobachtet. Der Komplex aus DNA, Kernprotein und Antikörper war oberhalb des Komplexes I deutlich als Bande zu erkennen (Bahn7). Die Familie der Sp-Transkriptionsfaktoren besteht aus einer Vielzahl von Proteinen, die in der Lage sind gleiche Promotorsequenzen zu erkennen und zu binden. Deshalb wurde neben  $\alpha$ -Sp1 zusätzlich ein spezifischer Antikörper gegen Sp3 eingesetzt. Im Gegensatz zu  $\alpha$ -Sp1, durch den sichtbare *Supershifts* auftraten, führte der Einsatz von  $\alpha$ -Sp3 zur Ausbildung von *Supershift*-Äquivalenten. Der Sp3-Antikörper band genau dort

an das Antigen, wo dieses mit der DNA-Sonde interagiert. Dadurch ging die DNA-Bindung verloren und das Aufheben der Komplexe I und III konnte beobachtet werden. Bestätigt wurden dieses Ergebnis durch Kombination der beiden Antikörper gegen Sp1 und Sp3 in Bahn 9, die zu einer vollständigen Aufhebung des typischen Bandenmusters der Sonde A führte. Auf Höhe des Komplexes I ist nur noch eine schmale Bande zu erkennen. Der Antikörper gegen AP-2 $\alpha$  führte dagegen zu keinem *Supershift*.

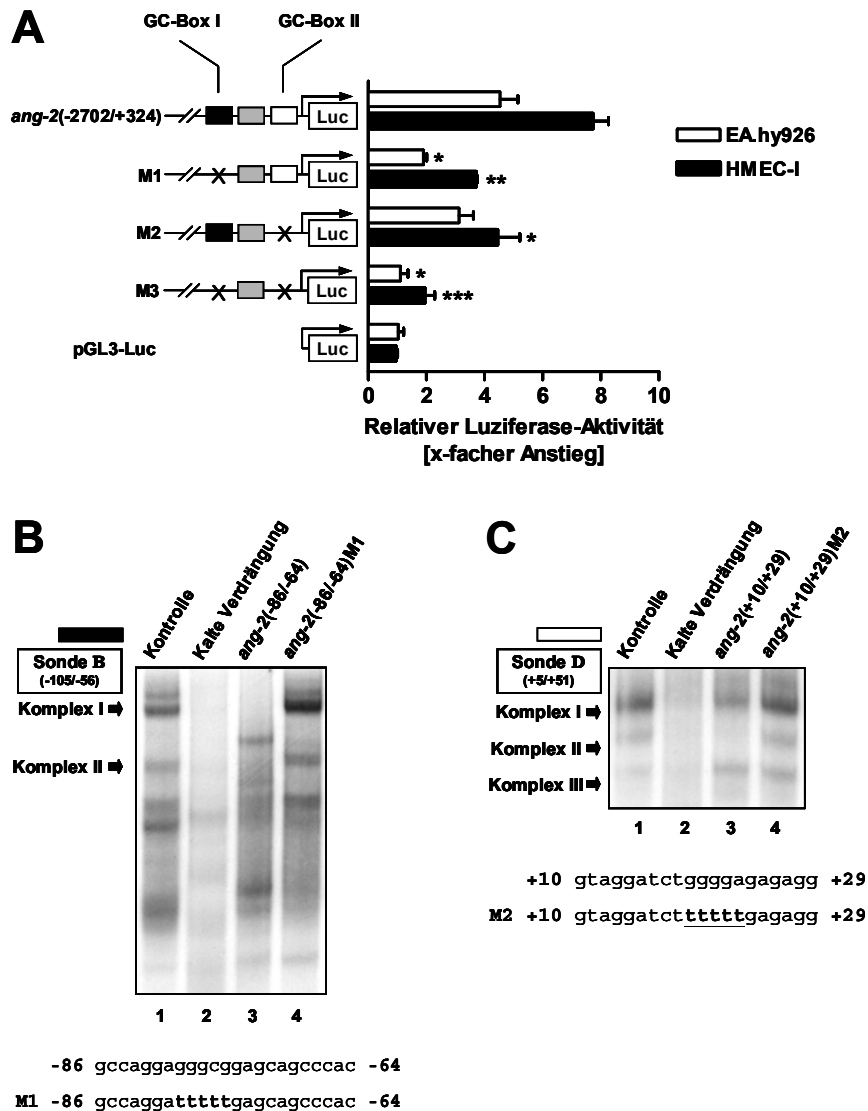
In gleicher Weise wurde mit den Sonden B und D verfahren. Ebenso wie bei der Sonde A (105/+51) beobachtet, führte ein Überschuss von Sp1 und AP-2 $\alpha$  Oligonukleotiden bei der Sonde B zur Verdrängung der DNA-Protein-Komplexe (Abb. 29B, Bahnen 3 und 5). Durch Antikörper gegen Sp1 und Sp3 wurden ebenfalls *Supershifts* beobachtet. Auffällig war das Auftreten von zwei *Supershift*-Komplexen in Gegenwart von  $\alpha$ -Sp1. Dabei interagiert  $\alpha$ -Sp1 mit einem Großteil der Kernproteine des Komplexes I. Ein kleiner sichtbarer Anteil blieb auf Höhe des Komplexes I stehen (Bahn 7). Das bereits bei Sonde A beobachtete Sp3-*Supershift*-Äquivalent wurde auch bei Sonde B detektiert (Bahn 8). Eine spezifische Bindung von AP-2 $\alpha$  an diesen Promotorabschnitt konnte ebenfalls durch *Supershift*-Analysen widerlegt werden (Bahn 10). In der Versuchsreihe mit der Sonde D (Abb. 29C) führte der Einsatz von Oligonukleotiden und Antikörpern gegen Transkriptionsfaktoren zu keiner wesentlichen Änderung des Bandenmusters im Vergleich zur Kontrolle (Bahn 1). Wie in Bahn 3 zu erkennen nahm die Intensität des Komplexes II durch einen Überschuss an Sp1 Consensus-Oligonukleotiden geringfügig ab.

Mit den *Supershift*-Analysen konnte eindeutig die Bindung der Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 an den Minimalpromotor *ang-2*(-105/+51) gezeigt werden.

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, welchen Auswirkungen die identifizierten Bindungsbereiche für Sp1 und Sp3 auf die Aktivierung des *ang-2* Promotors haben. Gezielt wurden Bindungsmotive für die Transkriptionsfaktoren in den potentiellen GC-Boxen I und II im Plasmid *ang-2*(-2702/+324) mutiert und die Auswirkungen mit Hilfe von transienten Transfektionen in EA.hy926 und HMEC-I Zellen überprüft. Hier wurde der Einfluss der putativen Bindungsstellen nicht nur im Minimalpromotor, sondern in einem größeren Fragment untersucht (Abb. 30A). Die Mutation des Bindungsmotivs in der GC-Box I (M1) bewirkte eine drastische Reduktion der Luziferase-Aktivität um mehr als 50% der maximalen Aktivierung durch *ang-2*(-2702/+324) in beiden Endothelzelllinien. Der Einfluss der GC-Box II auf die Promotoraktivität schien dagegen geringer zu sein. Die gezielte Einführung der Mutation M2 in das Bindungsmotiv führte zu einer Verringerung der Transaktivierung, welche mit einer Reduktion um nur 20% in EA.hy926 Zellen weniger stark ausgeprägt war als im Fall der Mutation M1 ( $p < 0,05$ ). Im zweiten Zellsystem wurde eine Reduktion um 40% gemessen ( $p < 0,05$ ). Die Kombination beider Mutationen im Konstrukt M3 resultierte in einer Reduktion der Transaktivierung auf 30% in EA.hy926 ( $p < 0,05$ ) bzw. 25% in HMEC-I ( $p < 0,01$ ) gegenüber dem Konstrukt *ang-2*(-2702/+324). Für die Gesamtaktivität scheinen beide Bindungsmotive in den Endothelzellen wichtig zu sein, auch wenn die Mutation der GC-Box II im Konstrukt M2 zu keiner signifikanten Änderung der Transaktivierung führte.

In Kompetitionsstudien wurden die Mutationen M1 und M2 näher betrachtet. Die Sonde B wurde sowohl mit dem Consensus-Oligonukleotid *ang-2*(-86/-64) als auch mit dem Oligonukleotid, das in

diesem Sequenzbereich die Mutation M1 trägt im molaren Überschuss inkubiert. Durch die Consensus-Sequenz wurden die Komplexe I und II vollständig verdrängt (Abb. 30B). Diese Reaktion wurde bereits in Kompetitionsuntersuchungen mit Sp1-Oligonukleotiden beobachtet (Abb. 29B). Dagegen veränderte sich das Bandenmuster der DNA-Protein-Komplexe unter Inkubation mit dem mutierten Oligonukleotid *ang-2*(-86/-64)M1 nicht. Die Mutation M2, die im Bereich der Sonde D liegt, wurde ebenfalls in EMSA-Analysen untersucht (Abb. 30C). Durch das Oligonukleotid *ang-2*(+10/+29) wurde der Komplex II fast vollständig verdrängt. Die Komplexe I und III blieben in ihrer Stärke erhalten. Die Mutation M2 im Oligonukleotid hatte keine Änderung in der Komplexbildung zur Folge.



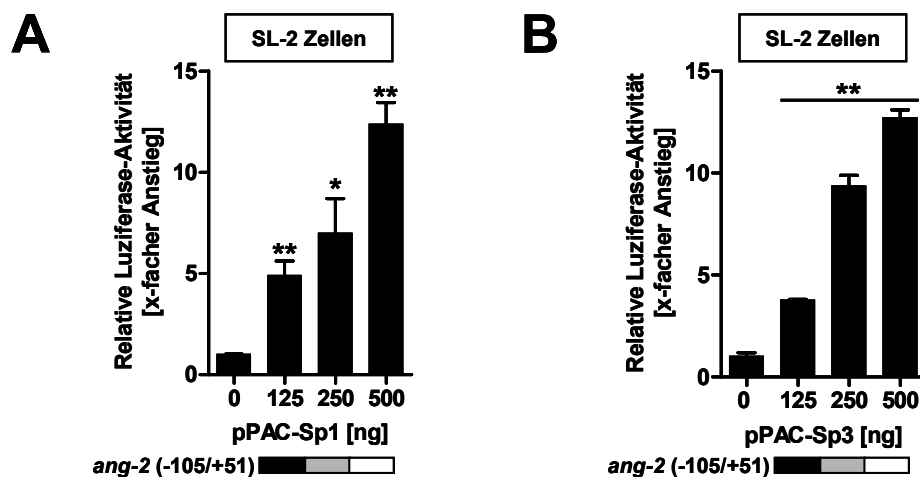
**Abb. 30: Verlust der Promotoraktivität durch Mutation der GC-Boxen im Minimalpromotor.**

Durch gezielte Mutation der GC-Boxen I und II im Abschnitt des minimalen Promotorbereichs wurde die Aktivität des Konstrukts *ang-2*(-2702/+324) verändert. A) Transfektionsstudien in EA.hy926 und HMEC-I Zellen zeigten, dass die Einführung der Mutation M1 in den Promotor zu einer signifikanten Abnahme der Aktivität führte. Die Mutation M2 bewirkte nur eine geringe nicht signifikante Verminderung der Promotoraktivität. Die Kombination beider Mutationen führte zu einer signifikanten Reduktion der relativen Luciferase-Aktivität auf das Niveau der pGL3-Kontrolle. Die Luciferase-Aktivität der verschiedenen Konstrukte ist als x-facher Anstieg in Bezug auf den Leervektor pGL3 dargestellt. Signifikanzen wurden mittels Student's t-Test für sämtliche Konstrukte im Vergleich zum Konstrukt *ang-2*(-2702/+324) berechnet (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ ). In Kompetitionsstudien (B und C) wurde die Veränderung des Bandenmusters der Sonden B (-105/-56) und D (+5/+51) durch Einführung der Mutationen M1 und M2 in die Verdrängungsoligonukleotide untersucht.

### 3.3.6 Funktionelle Analyse der Regulation von *ang-2* durch Sp-Transkriptionsfaktoren im *in vitro* Modell

Bisher konnte gezeigt werden, dass die Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 an den *ang-2* Promotor binden. Mit den Versuchen in *Drosophila melanogaster* SL-2 Zellen sollte dagegen gezeigt werden, dass diese Faktoren in der Lage sind, ein vom *ang-2* Promotor reguliertes Gen in einem *in vitro* Modell zu aktivieren und somit an dessen Regulation beteiligt sind. SL-2 Zellen eignen sich insbesondere für funktionelle Untersuchungen im Zusammenhang mit transaktivierenden Proteinen, da sie viele ubiquitär vorkommende mammalische Transkriptionsfaktor-Homologe wie Sp1 und Sp3 nicht exprimieren. Funktionelle Analysen sind so ohne Einfluss endogener Faktoren in diesem System möglich, da sie über Sp-Faktoren abhängige Promotoren keine Genexpression induzieren können [116].

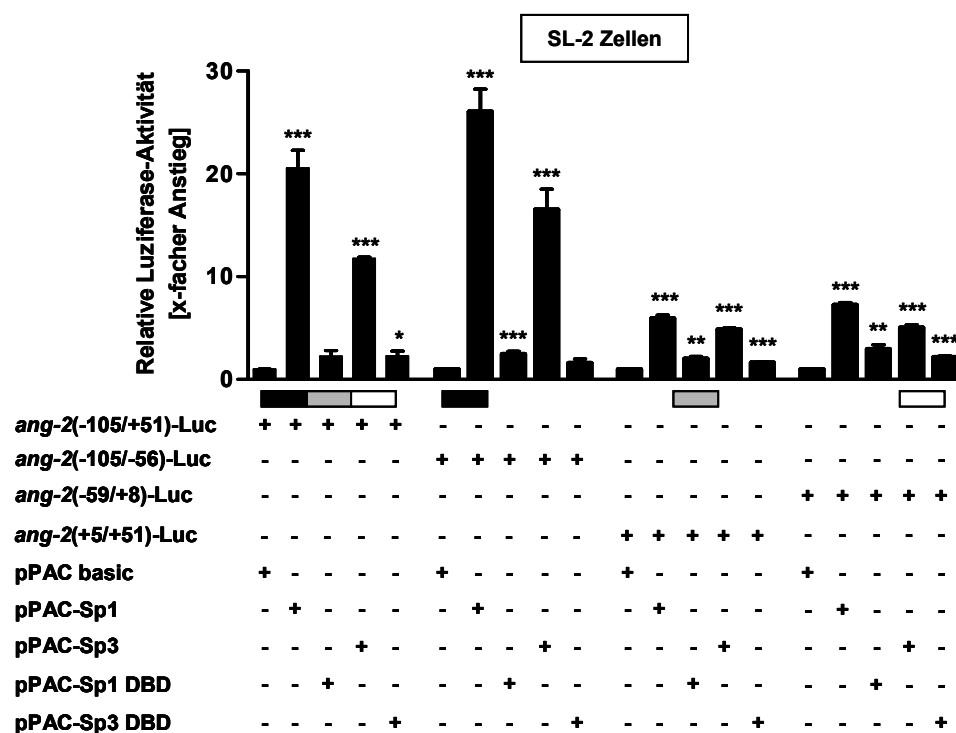
Zunächst wurde die Beteiligung der Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 an der Regulation von *ang-2* und die Responsivität des Minimalpromotors gegenüber diesen Faktoren mittels konzentrationsabhängiger Versuchsansätze geprüft. Überexpressionsplasmide für Sp1 und Sp3 im Vektorsystem pPAC wurden in verschiedenen Konzentrationen mit dem Reporterkonstrukt *ang-2*(-105/+51) in pT81 kotransfiziert (Abb. 31). Zwischen der Luziferaseaktivität und der Aktivität der Transkriptionsfaktoren besteht ein direkter Zusammenhang, der für die Auswertung genutzt wurde. Die Überexpressionen von Sp1 (Abb. 31A) und Sp3 (Abb. 31B) führten zu einer signifikanten Stimulation des Reporterplasids und zeigten, dass der *ang-2* Minimalpromoter hoch responsiv gegenüber Sp1 und Sp3 ist. Weiterhin wurde eine direkte Beziehung zwischen der Konzentration der Transkriptionsfaktoren und der Transaktivierung des Reporters nachgewiesen.



**Abb. 31:** Die Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 führen zu einer konzentrationsabhängigen Transaktivierung von *ang-2*(-105/+51) in *Drosophila melanogaster* SL-2 Zellen.

SL-2 Zellen wurden mit steigenden DNA-Mengen an Expressionsplasmid (pPAC) der Transkriptionsfaktoren Sp1 (A) oder Sp3 (B) mit dem Minimalpromotorkonstrukt (*ang-2*-105/+51) in pT81-Luc kotransfiziert. Zur Transfektion gleicher DNA-Mengen wurde mit dem Leervektor pPAC-basic aufgefüllt. Sowohl für Sp1 als auch für Sp3 konnte ein direkter signifikanter Zusammenhang zwischen der transfizierten Menge an Expressionsplasmid und der Induktion der Transaktivierung von *ang-2* nachgewiesen werden. Signifikanzen wurden mittels Student's t-Test berechnet (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ).

Auf Grundlage der Ergebnisse erfolgte eine detaillierte Betrachtung des Minimalpromotorelements *ang-2*(-105/+51) (Abb. 32). Durch die Kotransfektion von pPAC-Sp1 und *ang-2*(-105/+51) im Vektor pT81 stieg die relative Luziferase-Aktivität signifikant auf das über 20-fache im Vergleich zum Kontrollvektor pPAC basic an. Die Überexpression von Sp3 resultierte in einem 12-fachen Anstieg der relative Luziferase-Aktivität gegenüber der Kontrolle. Die Daten dieser funktionellen Untersuchung untermauern die Bindungsstudien (Abb. 29A), in denen Sp1 und Sp3 als transaktivierende Proteine für den *ang-2* Promotorbereich (-105/+51) identifiziert wurden. Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch Kotransfektionen mit Überexpressionsplasmiden für Sp1 und Sp3, die sich durch fehlende DNA-Bindedomänen (DBD) für diese Transkriptionsfaktoren auszeichnen. Durch diese Konstrukte kam es zu keiner Aktivierung des Reporters. Die gemessene Aktivierung des Promotorelements war somit auf eine spezifische Bindung der überexprimierten Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 an den Promotorbereich (-105/+51) zurückzuführen. In gleicher Weise wurde mit den Teilfragmenten des Minimalpromotors verfahren. Besonders auffällig war das Konstrukt B (-105/-56), das von Sp1 und Sp3 eine stärkere Aktivierung erfuhr als das Gesamtfragment. Die Transaktivierung der Konstrukte C (-59/+8) und D (+5/+51) lag dagegen unter 50% im Vergleich zu *ang-2*(-105/+51).



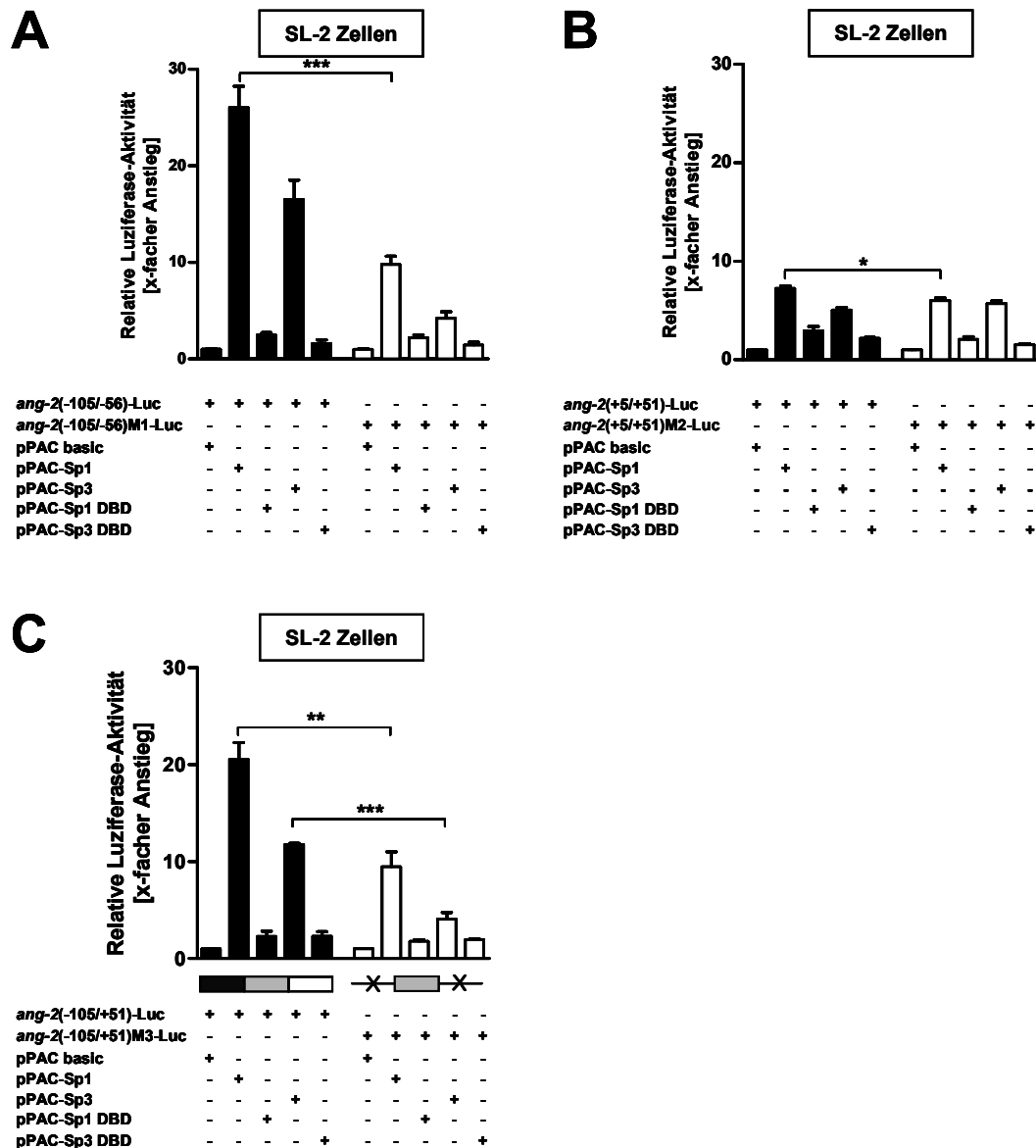
**Abb. 32: Interaktion der Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 mit dem Minimalpromotor *ang-2*(-105/+51) in *Drosophila melanogaster* SL-2 Zellen.**

SL-2 Zellen wurden mit jeweils 250 ng Konstrukt der verschiedenen Fragmente des *ang-2* Minimalpromotors (Konstrukt A, B, C oder D) und 500 ng des Leervektors pPAC-basic oder der Expressionskonstrukte für Sp1 bzw. Sp3 kotransfiziert. Die relative Luziferase-Aktivität ist als x-facher Anstieg bezüglich der mit dem Promotorkonstrukt und pPAC-Leervektor kotransfizierten Kontrollen dargestellt. Die Überexpression von Sp1 und Sp3 führte in Gegenwart der Sonden zur Stimulation der Luziferase-Aktivität. Durch den Einsatz von Sp1- und Sp3-Überexpressionsplasmiden, die durch fehlende DNA-Bindedomänen gekennzeichnet sind (pPAC-Sp1/3 DBD), konnte die spezifische Bindung von Sp1 und Sp3 an den *ang-2* Promotorbereich bestätigt werden. Signifikanzen wurden mittels Student's t-Test bezogen auf die jeweiligen Kontrollen berechnet (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ ).



Die Mutation der GC-Boxen I und II wurde bereits in EA.hy926 und HMEC-I Zellen untersucht und führte in diesem Modell zu einer Reduktion der relativen Luziferase-Aktivität nach transienten Transfektionen (Abb. 30A). Auch in *Drosophila melanogaster* SL-2 Zellen wurde die Aktivität der Teilfragmente des *ang-2* Promotors durch Mutation der Bindungsmotive für Sp-Faktoren signifikant reduziert. Vor allem die Mutation der Basen -79 bis -75 im Bereich des *ang-2* Konstrukts B (GC-Box I) resultierte in eine verminderte Aktivierung von *ang-2*(-105/-56)M1 durch Sp1 und Sp3 (Abb. 33A). Setzt man die Daten der Mutanten mit denen des nicht-mutierten *ang-2* Konstrukts B ins Verhältnis, wird deutlich, dass die Reduktion der Transaktivierung durch Sp3 um das 3,9-fache stärker ausfiel als im Fall von Sp1, bei dem die Mutation der Consensus-Sequenz nur zu einer Verringerung um das 2,7-fache führte. Im Gegensatz dazu standen die Ergebnisse bezüglich der GC-Box II. Die Mutation M2 war bereits in den Endothelzellen als weniger relevant aufgefallen (Abb. 30A). Hier führte sie nur zu einer 30%igen Reduktion der Reporteraktivität. Jedoch wurde sie als wichtig angesehen, da durch Kombination mit M1 die relative Transaktivierung fast auf das Niveau der Kontrolle abfiel. In SL-2 Zellen dagegen trat kein Unterschied durch die Mutation der GC-Box II im Bereich des Konstrukts D auf. Sowohl für pPAC-Sp1 als auch für pPAC-Sp3 wurden ähnliche Änderungen der Reporteraktivität in *ang-2*(+5/+51) gemessen. Durch die Mutation M2 wurde keine wesentliche Veränderung der Reporteraktivität beobachtet (Abb. 33B). Die Kombination beider Mutationen im Konstrukt *ang-2*(-105/+51)M3 ist in Abb. 33C dargestellt. Unter dem Einfluss von Sp1 sank die Aktivität um ca. 55% gegenüber dem Wildtyp. Im Versuch mit pPAC-Sp3 war der Abfall um ca. 75% noch stärker ausgeprägt.

Im *in vitro* Modell der *Drosophila melanogaster* SL-2 Zellen konnten die Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 als Aktivatoren des *ang-2* Reportergenkonstrukts identifiziert werden. Die Überexpression des Transkriptionsfaktors Sp1 bewirkte in diesem System eine stärkere Aktivierung des *ang-2* Reporters als der Faktor Sp3.

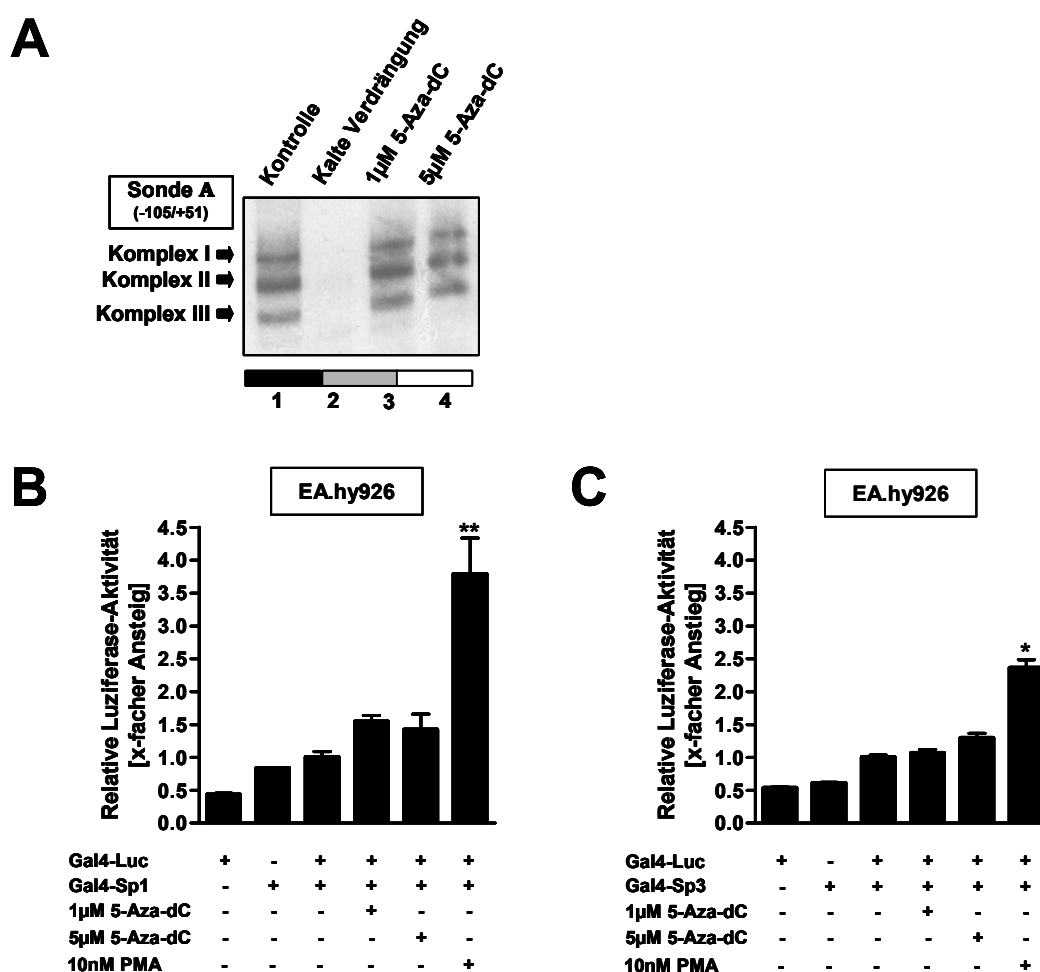


**Abb. 33:** Die Mutation der GC-Box I im Minimalpromotorbereich führte zu einer veränderten Interaktion der Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 in *Drosophila melanogaster* SL-2 Zellen.

A) Durch die Mutation der GC-Box I wurde das Bindungspotential von Sp1 und Sp3 an die Sequenz *ang-2(-105/-56)* (Konstrukt B) signifikant verringert. B) Dagegen führte die Mutation der GC-Box II zu keiner Veränderung der Expression des Konstrukts D *ang-2(+5/+51)*. C) Durch Kombination beider Mutationen in dem Konstrukt A *ang-2(-105/+51)* sank die Luciferaseaktivität signifikant gegenüber dem Wildtyp, jedoch war die Änderung geringer als in dem Konstrukt B mit der Mutation M1. Signifikanzen wurden mittels Student's t-Test berechnet (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

### 3.3.7 Sp1/Sp3-vermittelte *ang-2* Minimalpromotor Aktivierung wurde nicht durch 5-Aza-dC beeinflusst

Unter 3.1 und 3.2 wurde gezeigt, dass globale Demethylierung mittels 5-Aza-dC zu einer Induktion der *ang-2* Expression führte. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob diese Induktion auf eine vermehrte Bindung der Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 zurückzuführen ist oder aber über eine verstärkte Aktivierung der Transkriptionsfaktoren erfolgt (Abb. 34).



**Abb. 34: Weder die DNA-Protein-Komplexbildung von Sp1 und Sp3 noch deren Transaktivierung wurden durch 5-Aza-dC beeinflusst.**

A) Nukleäre Extrakte wurden aus HMEC-I Zellen nach Stimulation mit 5-Aza-dC über 72 Stunden gewonnen und in Bindungsstudien mit der Sonde A (-105/+51) verwendet. Die unter Kontrollbedingungen formierten Komplexe I bis III wurden in ihrer Intensität durch 5-Aza-dC nicht verändert. Der Einfluss von 5-Aza-dC auf die Transaktivierung von Sp1 und Sp3 wurde im Gal4-Luziferase-System überprüft. EA.hy926 Zellen wurden mit dem Reportergenkonstrukt Gal4-Luc allein oder zusammen mit den Expressionsplasmiden Gal4-Sp1(B) bzw. Gal4-Sp3 (C) transient transfiziert und mit 5-Aza-dC oder PMA als Positivkontrolle über 24 Stunden stimuliert. Die Werte der unstimulierten Kotransfektionen von Gal4-Luc mit Gal4-Sp1 bzw. Gal4-Sp3 wurden willkürlich 1 gesetzt und dienten als Bezug für die relativen Änderungen der Luziferase-Aktivität. Signifikanzen wurden mittels Student's t-Test berechnet (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ).

Um mögliche Effekte des DNMT-Inhibitors 5-Aza-dC auf die Bindung der Transkriptionsfaktoren zu untersuchen, wurden nach Inkubation von HMEC-I Zellen mit 5-Aza-dC Bindungsstudien mit den Kernextrakten durchgeführt. Die Behandlung der Zellen hatte jedoch keinen Einfluss auf die DNA-Protein-Komplexbildung (Abb. 34A).

Da 5-Aza-dC keine Veränderung der Sp1 und Sp3 DNA-Protein-Komplexe bewirkte, wurden anschließend die Effekte von 5-Aza-dC auf die Sp1 und Sp3 abhängige Transaktivierung unter Verwendung

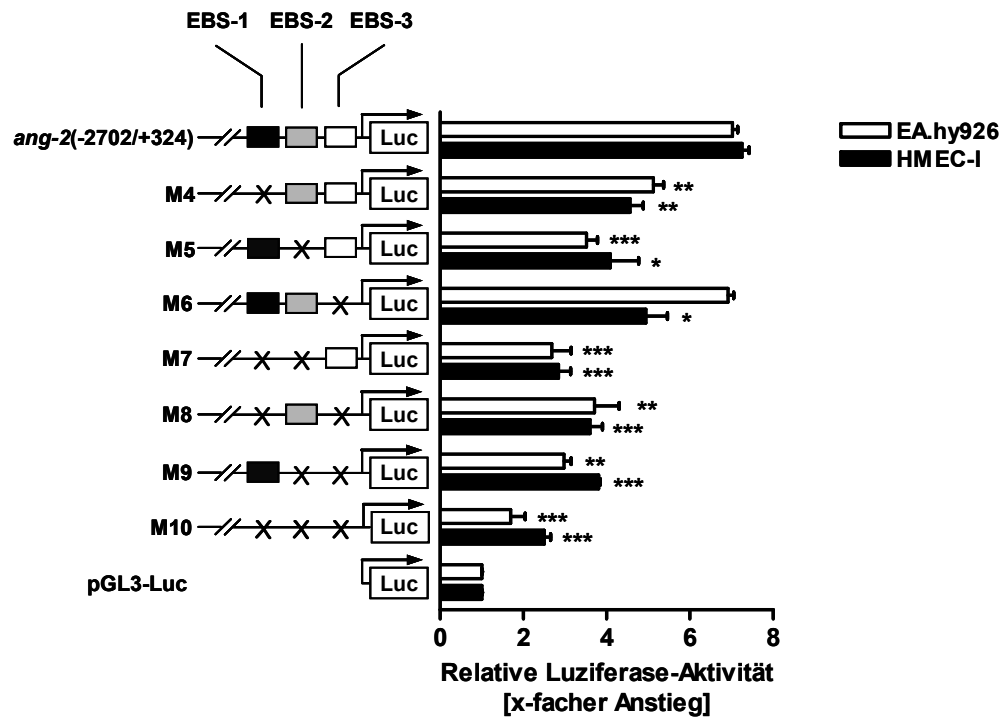
des Gal4-Luziferase-Systems untersucht (Abb. 34B und C). Hierzu wurden Gal4<sup>15</sup>-DBD-Fusionsproteine mit einem Gal4-abhängigen Reportergen in transienten Transfektionsstudien mit der endothelialen Zelllinie EA.hy926 verwendet. Die Fusionsproteine zeichnen sich durch die DNA-Bindedomäne des Hefetranskriptionsfaktors Gal4 aus, welche mit der Aktivierungsdomäne der Transkriptionsfaktoren Sp1 bzw. Sp3 gekoppelt wurden. Durch Kotransfektion des Luziferase-Reportergenkonstrukts (Gal4-Luc), das stromaufwärts des Luziferasegens fünf Gal4-Bindestellen enthält, kann das Potential von Sp1 und Sp3 zur Transaktivierung gemessen werden. Zusätzlich wurden die Zellen nach der Transfektion für 24 Stunden mit 5-Aza-dC stimuliert. Eine Verstärkung der transaktivierenden Wirkung von Sp1 oder Sp3 nach Behandlung mit 5-Aza-dC sollte zu einer verstärkten Transkription des Gal4-Luziferase Konstrukts führen. Die Kotransfektion des Reportergenkonstrukts Gal4-Luc mit Gal4-Sp1 bzw. Gal4-Sp3 führte zu einer Zunahme der Luziferase-Aktivität im Vergleich zum Reportergenkonstrukt unter basalen Bedingungen. Die Stimulation mit 1 bzw. 5 µM 5-Aza-dC führte jedoch weder für Sp1 noch für Sp3 zu einer signifikanten Erhöhung der relativen Luziferase-Aktivität, so dass ein aktivierender Effekt von 5-Aza-dC auf die Transkriptionsfaktoren ausgeschlossen werden konnte. Sowohl das Gal4-Sp1- als auch das Gal4-Sp3-Fusionsprotein wurden durch die PMA-Kontrolle signifikant aktiviert.

### 3.3.8 Mutation potentieller Bindungsmotive für Transkriptionsfaktoren der ETS-Familie

Basierend auf den Arbeiten von Hasegawa *et al.* [117] und Hegen *et al.* [118], die unabhängig von einander Transkriptionsfaktoren der ETS-Familie als relevant für die Regulation der *ang-2* Expression identifiziert haben, wurden Transfektionsstudien in den Endothelzellen EA.hy926 und HMEC-I durchgeführt. Mittels SDM wurden Mutationen in die putativen ETS-Bindungsstellen (EBS, *Ets binding site*), die mittels Sequenzanalyse identifiziert wurden (Abb. 27A), in das Konstrukt *ang-2*(-2702/+324) im Vektor pGL3 eingeführt. Die Auswirkungen auf die Expression wurden wiederum über Luziferase-Messungen bestimmt. Hierbei sollten die Auswirkungen der Mutationen in einem genetischen Kontext untersucht werden, der über den Minimalpromotor *ang-2*(-105/+51) hinausging (Abb. 35).

In beiden Zelllinien führten die Mutationen zur Änderung der Transaktivierung. Mutation von EBS-1 (M4) und EBS-2 (M5) resultierten in einem Rückgang um 25% ( $p < 0,01$ ) bzw. 50% ( $p < 0,001$ ) in EA.hy926 Zellen. Dagegen hatte die Änderung des Bindungsmotivs in EBS-3 (M6) keinen Einfluss auf die Aktivität, die auf dem Niveau des Konstrukts *ang-2*(-2702/+324) verblieb. Die Kombination der Mutation untereinander resultierte in signifikanten Aktivitätsverlusten um 50 bis 60%. Durch Mutation der drei EBS im Konstrukt M10 sank die Aktivität dramatisch ab und lag nur geringfügig über dem Niveau des Leervektors pGL3 ( $p < 0,001$ ). Die gemessenen Änderungen der relativen Luziferase-Aktivität in der zweiten Zelllinie HMEC-I waren ähnlich. Ausnahme stellte die Mutation der EBS-3 dar (M6), die in HMEC-I Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Aktivität von 30% gegenüber der Kontrolle *ang-2*(-2702/+324) führte ( $p < 0,05$ ).

<sup>15</sup> Das Gal-4 Protein der Hefe ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression verschiedener Enzyme des Galaktose-Stoffwechsels reguliert.



**Abb. 35:** Mutation von EBS-1 bis 3 führte zu einer signifikanten Reduktion der *ang-2* Promotoraktivität in Endothelzellen.

Durch Mutation der putativen Bindungsmotive für ETS-Transkriptionsfaktoren (EBS) im Bereich des Minimalpromotors wurde die Aktivität des Konstrukts *ang-2(-2702/+324)* in den Zelllinien EA.hy926 und HMEC-I signifikant reduziert. Die Luciferase-Aktivität der verschiedenen Konstrukte ist als x-facher Anstieg in Bezug zum Leervektor pGL3 dargestellt. Signifikanzen wurden mittels Student's t-Test für sämtliche Konstrukte im Vergleich zum längsten Konstrukt *ang-2(-2702/+324)* berechnet (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

## 4 Diskussion

Die prominente Stellung von Angiopoietin-2 (Ang-2) in der vaskulären Entwicklung sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen ist weitgehend belegt worden. Als endothelspezifischer Faktor nimmt Ang-2 eine besondere Position ein. Vor allem die Rolle von *ang-2* in der tumorassoziierten Angiogenese rückt immer stärker in den Mittelpunkt von Untersuchungen. Blutgefäße in Tumoren zeichnen sich durch eine veränderte Architektur gegenüber physiologischen Bedingungen aus: Sie sind unausgereift, durchlässig und stark gewunden. Eine verstärkte Expression von *ang-2* könnte ursächlich an den Veränderungen beteiligt sein. Für verschiedene humane Tumorentitäten konnte in diesem Zusammenhang eine erhöhte *ang-2* Expression im Endothel nachgewiesen werden.

Aufgrund der physiologischen und pathologischen Bedeutung von Ang-2 sollten mit dieser Arbeit über eine funktionelle und strukturelle Analyse Mechanismen der *ang-2* Regulation aufgedeckt werden. Ziel der Arbeit war, neben der Untersuchung des Einflusses von epigenetischen Mechanismen auf die *ang-2* Regulation, die Identifikation von regulatorischen Elementen, die von Interesse für pro- und antiangiogene Therapien sein könnten.

### 4.1 Epigenetische Regulation

Die zelltypspezifische Expression vieler Gene steht unter epigenetischer Kontrolle, die auf Konformationsänderungen des Chromatins und der damit zusammenhängenden Zugänglichkeit des Transkriptionsapparats basieren. Durch Änderung des DNA-Methylierungsmusters [77] und/oder der Modifikation von Histonen [92,93] kann die Chromatinstruktur moduliert und somit die Expression von Genen beeinflusst werden. Im Zusammenhang mit der Initiation und Progression von Tumoren wird eine anormale Hypermethylierung diskutiert, die zur verminderten Expression von Tumorsuppressorgenen führt und die Entstehung von Neoplasien fördert [119]. Außerdem steht die Hypomethylierung, welche das gesamte Genom betrifft und deren Einfluss auf die neoplastische Progression verschiedener humaner Tumoren zur Diskussion [120].

Bei der Karzinogenese stehen vor allem Veränderungen im Tumor, also in den Epithelzellen im Vordergrund. Für die Biologie des Tumors sind jedoch auch Veränderungen des umliegenden Gewebes, dem Tumorstroma, mit dem die Tumorzellen in ständiger Wechselwirkung stehen, relevant [121]. Versteht man die Karzinogenese, die zu einem invasiven und metastasierenden Tumor führt, als eine fehlgesteuerte Antwort eines gesamten Gewebes bzw. Organs auf genetischen und/oder epigenetischen Stress (z.B. Hypoxie, das Gewebsmikromilieu oder metabolischer Stress), dann rückt das Wissen um Veränderungen im Tumorstroma in den gleichen Blickwinkel wie das Wissen um die Tumorzellen selbst [122]. Endothelzellen im Tumorstroma sind an der Induktion der Tumorangiogenese beteiligt, welche die Progression von Tumoren fördert wie im Kapitel 1 dieser Arbeit besprochen wurde. Ein verändertes Expressionsprofil von pro- und/oder antiangiogenen Genen, abhängig von epigenetischen Veränderungen in den Endothelzellen, könnte ursächlich an der tumorassoziierten Angiogenese beteiligt sein.

In dieser Arbeit wurde untersucht, welchen Effekt Demethylierung, induziert durch 5-Aza-dC (5-Aza-2'-deoxycytidine), auf die Expression von angiogeneserelevanten Genen in Endothelzellen hat. Das Nukleosidanalogue wird während der Zellteilung bei der DNA-Replikation in den neusynthetisierten DNA-Strang eingebaut und bindet irreversibel die DNA-Methyltransferase-1 (DNMT1) wodurch die Konzentration von frei vorliegender DNMT1 in den Zellen reduziert wird [109,123]. Von der induzierten Hypomethylierung ist die gesamte DNA betroffen und somit auch CpG-Dinukleotide in Promotorbereichen. Demethylierung von hypermethylierten Promotoren kann zu einer verstärkten Expression der betroffenen Gene führen. Hellebrekers *et al.* untersuchten den Effekt von DNMT-Inhibitoren auf aktivierte tumorkonditionierte Endothelzellen [124,125]. Sie zeigten mit ihren Versuchen, dass DNMT-Inhibitoren antiproliferativ wirken und Angiogenese sowohl *in vitro* als auch *in vivo* hemmen [124]. Bisher sind fast keine Daten darüber veröffentlicht wie nicht-transformierte Zellen auf die Inhibitoren reagieren. Diese Untersuchungen sind jedoch von Wichtigkeit, da diese Zellen potentielle Ziele von unerwünschter Genaktivierung in Tumor-Patienten sein können, die Therapien mit Methylierungsinhibitoren durchlaufen. Im Vergleich zu Hellebrekers *et al.* [124,125], wurden in der vorliegenden Arbeit die Effekte der globalen Demethylierung auf die Genexpression von nicht-konditionierten proliferierenden Endothelzellen *in vitro* untersucht.

#### 4.1.1 Induktion der *ang-2* Expression in Endothelzellen durch globale Demethylierung induziert

Aufgrund des speziellen Expressionsprofils von *ang-2*, das im Wesentlichen auf Endothelzellen beschränkt ist, lag die Vermutung nahe, dass dieses Gen durch epigenetische Mechanismen reguliert wird. Durch die Kultivierung verschiedener endothelialer und epithelialer Zelllinien mit der demethylierenden Substanz 5-Aza-dC und die Untersuchung der *ang-2* Expression wurde dieser Frage nachgegangen. Im Gegensatz zu Hegen *et al.*, die durch 5-Aza-dC keine Induktion der *ang-2* Expression in Tumorzellen beobachten konnten [118], wurde in der vorliegenden Arbeit *ang-2* in Abhängigkeit von der 5-Aza-dC Konzentration in der Zervixkarzinomzelllinie HeLa induziert. Entgegen den Erwartungen führte die Kultivierung der Endothelzelllinien EA.hy926 und HMEC-I sowie der Epithelzellen AGS, die bereits unter Kontrollbedingungen *ang-2* exprimierten in Gegenwart von 5-Aza-dC zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der *ang-2* Expression. In Übereinstimmung mit der Arbeit von Hegen *et al.* [118], wurde in der vorliegenden Arbeit neben *ang-2* auch die Expression von *tie-2* in Tumorzellen (HeLa) induziert (Abb. 12). Die Diskrepanzen zwischen den vorliegenden Daten und denen von Hegen *et al.* sind vermutlich auf unterschiedliche Zellsysteme und verwendete Konzentrationen des demethylierenden Reagenz zurückzuführen. Die generierten Daten ließen darauf schließen, dass die *ang-2* Transkription unter der Kontrolle methylierungsabhängiger Mechanismen steht. Die quantitative Untersuchung des Einflusses von Demethylierung in Endothelzellen zeigte, dass auch in primären Endothelzellen (HUVEC) die *ang-2* Expression gesteigert wird, obwohl diese Zellen bereits unter Kontrollbedingungen durch eine sehr hohe *ang-2* Expression charakterisiert sind. Der CpG-Plot offenbarte allerdings, dass in unmittelbarer Nähe des Transkriptionsstarts keine CpG-Inseln im *ang-2* Promotor lokalisiert sind. Die zwei vorhandenen CpG-reichen Regionen stromaufwärts vom Transkriptionsstart entsprachen nicht den Kriterien von

Gardiner-Garden und Frommer [82] und wurden daher als nicht relevant für die *ang-2* Regulation in Verbindung mit Methylierung angesehen.

Neben der Methylierung von CpGs ist die Histon-Modifizierung durch Acetylierung wesentlich an der Konformationsänderung der Chromatinstruktur beteiligt [92,93]. Durch Hemmung der Histondeacetylasen (HDAC) werden Histone verstärkt acetyliert und das Chromatin in eine aufgelockerte, für den Transkriptionsapparat besser zugängliche Struktur gebracht. Der Einsatz von TSA (Trichostatin A), einem HDAC-Inhibitor, hatte jedoch keinen Einfluss auf die *ang-2* Expression. Auch synergistische Effekte von DNMT- und HDAC-Inhibitoren auf die Genexpression wie sie in der Literatur beschrieben sind [99,100], konnten in dieser Arbeit für die *ang-2* Expression nicht gezeigt werden.

Die Untersuchungsergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern erstmalig eindeutige Hinweise, dass die *ang-2* Expression DNMT-abhängig reguliert wird, diese Regulation jedoch sehr wahrscheinlich unabhängig von DNA-Methylierung im unmittelbaren Promotorbereich erfolgt.

#### **4.1.2 Untersuchung der Expression angiogeneserelevanter Gene in Endothelzellen nach globaler Demethylierung im explorativen *Microarray***

Durch die Kombination von globaler Demethylierung mittels 5-Aza-dC und dem *Human Whole Genome Oligo Microarray* der Firma Agilent sollten die genomweiten Auswirkungen von induzierter Hypomethylierung in Endothelzellen untersucht werden. Im Vordergrund der Analyse standen Gene, die im Zusammenhang mit Angiogenese diskutiert werden. In der explorativen *Microarray*-Analyse wurden die Endothelzelllinie EA.hy926 sowie die endothelialen Primärzellen HUVEC verwendet. Der Vergleich beider Zelllinien zeigte Überschneidungen aber auch Abweichungen bezüglich der Expressionsänderungen nach induzierter Demethylierung. Die Expressionsdaten nach Inkubation mit 1  $\mu$ M 5-Aza-dC wurden direkt miteinander verglichen. Diese 5-Aza-dC Konzentration lag im Bereich, der für unterschiedliche Zelltypen verwendet wird. Darüber hinaus ist die eingesetzte Konzentration im Einklang mit der 5-Aza-dC *steady state* Serumkonzentration bei Patienten, die mit dem DNMT-Inhibitor behandelt werden [126] und weist auf physiologische Behandlungskonditionen hin. Von den 59.950 *Probe Sets* des *Human Whole Genome Oligo Microarrays* wurden 3,8% in beiden Zelllinien induziert ( $FC > 2$ ); 1% der Transkripte zeigten eine verminderte Expression ( $FC < 0,5$ ). Die relativ geringe Anzahl an differentiell regulierten Genen nach Behandlung mit 5-Aza-dC deutet auf einen spezifischen Effekt des DNMT-Inhibitors auf molekularer Ebene hin. Um angiogeneserelevante Gene zu filtern, wurde auf eine bisher unveröffentlichte Metaanalyse von Anders *et al.* (persönliche Kommunikation) zugegriffen (ANGIOGENESE-LISTE). Hier sind Gene erfasst, die bei der Angiogenese von Bedeutung sein könnten. Aus dieser Liste wurden 24 Gene durch genomweite Hypomethylierung verstärkt exprimiert. Dazu zählten unter anderem Peptidasen, z.B. *MMP19*, *ADAMTS2* und *ADAMTS17* sowie Zytokine (*IGF2*, *FGF20*). Sieben Transkripte aus der ANGIOGENESE-LISTE unterlagen dagegen einer Repression ihrer Expression.

Über den *Microarray* wurden weder für EA.hy926 noch für HUVEC Zellen Gene als differentiell reguliert identifiziert, die den Anstieg der *ang-2* Expression nach Behandlung mit 5-Aza-dC erklären würden. Hierdurch wird die Hypothese untermauert, dass *ang-2* direkt DNMT-abhängig reguliert wird.



Im Folgenden sollen ausschließlich Gene diskutiert werden, deren Expression im Array als induziert identifiziert werden konnten. Nur für Gene mit einer gesteigerten Expression ist es wahrscheinlich, dass die gemessenen Expressionsänderungen auch ursächlich auf einen direkten 5-Aza-dC Effekt zurückzuführen sind. Gene deren Expression hingegen im experimentellen Ansatz als vermindert identifiziert wurden, scheinen nicht direkt unter dem Einfluss von Methylierung zu stehen. Es ist eher davon auszugehen, dass in diesen Fällen die Expressionsänderung auf einer durch Demethylierung eines anderen Gens induzierten Kaskade beruht.

Die nachstehend näher betrachteten Gene werden wie *ang-2* im Rahmen der physiologischen und pathologischen Angiogenese diskutiert. Von besonderem Interesse war die Induktion von *ephrinB2* und des Rezeptors *notch4*.

Neben VEGF und Angiopoietinen sind die Ephrine und ihre Rezeptoren, die zu den Rezeptor-Tyrosin-Kinasen gehören eine wichtige Gruppe vaskulär morphogener Moleküle [21]. In der vorliegenden Arbeit wurde der Ligand *ephrinB2* nach Demethylierung in Endothelzellen induziert. Ursprünglich wurden Ephrine und deren Rezeptoren als Wegweiser für auswachsende Axone im Gehirn beschrieben [127], doch mittlerweile sind auch ihre Funktionen für das Gefäßsystem eindeutig belegt. Sie steuern das Auswachsen von sprossenden Kapillaren und die asymmetrische Differenzierung von arteriellen und venösen Gefäßen. Basierend auf der Arbeit von Wang *et al.* wurde die selektive Expression von *ephrinB2* in arteriellen Endothelzellen während der Angiogenese beschrieben [128]. Sein Rezeptor *ephB4* wird dagegen weitgehend selektiv von venösen Endothelzellen exprimiert [128,129]. Deletionen von *ephrinB2* oder *ephB4* haben einen identischen Phänotyp zur Folge, der sich durch weitgreifende Defekte im Gefäßumbau, in der Aufrechterhaltung der venösen und arteriellen Differenzierung von Endothelzellen sowie in der vaskulären Integrität auszeichnet [128]. Durch die EphrinB2 induzierte Signalkaskade wird Migration, Adhäsion, Chemotaxis und Aussprossung von Kapillaren gefördert; über den EphB4-Signalweg wird hingegen die Angiogenese gehemmt [130,131]. Eine nicht ausbalancierte Expression von *ephrinB2* und *ephB4* in Tumorgefäßen könnte ursächlich an der anormalen Architektur der Gefäße, verbunden mit dem Verlust der arteriovenösen Identität beteiligt sein wie es Masood *et al.* für das Kaposi-Sarkom bereits gezeigt haben [132].

In Verbindung mit EphrinB2 ist die Induktion des Rezeptors *notch4* nach Hypomethylierung von Interesse. Hainaud *et al.* zeigten, dass die Stimulation von HUVEC Zellen mit VEGF zur Aktivierung von Notch4 führte, begleitet von einer verstärkten *ephrinB2* Expression und einer Reduktion der *ephB4* mRNA, die einer Veränderung des Phänotyps der Zellen von venös zu arteriell gleichkommt [133]. Über den Notch-Signalweg wird das Zellschicksal von unreifen Vorläuferzellen bei Differenzierungsvorgängen diktiert [111] und die Bildung von Gewebsgrenzen festgelegt [112], welche für die Entwicklung und das Überleben eines Organismus wichtig sind. Über diesen Signalweg erhalten die Zellen Reize, die Proliferation und Apoptose steuern [113]. Der Notch-Signalweg spielt vermutlich sowohl während des angiogenen Umbaus als auch bei der arteriovenösen Differenzierung in Endothelzellen eine entscheidende Rolle.

Darüber hinaus wurde in HUVEC Zellen nach Behandlung mit 5-Aza-dC ein Anstieg der *dll4* Expression (FC 3,46), einem Notch4-Liganden gemessen. Der Signalweg Dll4-Notch-EphrinB2 wird mit dem anormalen Umbau von Tumorgefäßen diskutiert. Durch Aktivierung der Signalkaskade wird die Angiogenese von der proliferativen Phase in den Zustand der Reifung und Stabilisierung

umgeschaltet [134]. Die Überexpression von *dll4* führte zur Ausbildung von wenig verzweigten, funktionellen Gefäßen *in vitro*. Heinaud *et al.* stellten die Hypothese auf, dass venöse Endothelzellen während der Tumorangiogenese arterielle Marker wie *dll4*, *notch4* und *ephrinB2* verstärkt exprimieren [133]. Die Stimulation von venösen Endothelzellen mit VEGF führte zur Induktion von *dll4*, welche eine Aktivierung von Notch4 sowie eine verstärkte Expression von *ephrinB2* nach sich zog [133]. Dies ist in Übereinstimmung mit der Annahme von Harrington *et al.*, dass die Tumervaskulatur arteriellen Ursprungs sei [134]. Über Inhibierung des Notch-Signalwegs in Tumoren wird die Ausbildung von Blutgefäßen induziert, aber gleichzeitig ein Rückgang des Tumorwachstums verzeichnet [134–136]. Dieses Paradox wird durch die Struktur der gebildeten Gefäße geklärt, die sich durch viele kleine ungeordnete Verzweigungen auszeichnen. Diese Gefäße sind jedoch nur gering oder überhaupt nicht funktionell und tragen somit nicht zur Versorgung des Tumors mit Sauerstoff bei. Auf dieser Basis entstand das Konzept der Tumorbehandlung durch *abnormalization* von Tumorgefäßen: eine Therapie die zur Ausbildung von nicht-funktionellen Tumorgefäßen führt und so das Tumorwachstum negativ beeinflusst, selbst wenn durch die Behandlung das Tumorendothel an Masse zunimmt [136].

Mittels des *Microarrays* wurde gezeigt, dass durch induzierte genomweite Hypomethylierung in proliferierenden nicht-tumorkonditionierten Endothelzellen Gene induziert wurden, die in Verbindung mit Angiogenese betrachtet werden. Neben *ang-2* wurden mit *dll4*, *notch4* und *ephrinB2* drei Gene eines Signalwegs in venösen Endothelzellen induziert, deren Expression unter physiologischen Bedingungen vor allem in arteriellen Endothelzellen aufgezeigt wurde. Ob die Induktion von *ephrinB2* am Ende dieses Signalwegs direkt auf der Hypomethylierung des *ephrinB2* Gens zurückzuführen ist oder aber auf Induktion der vorangestellten Gene, muß durch weitere Versuche geklärt werden.

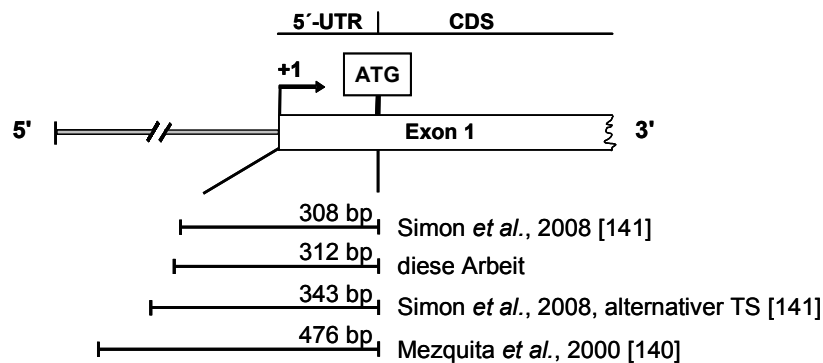
Die beschriebenen Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Arbeiten die eine angiostatische Wirkung von DNMT-Inhibitoren nahe legen [124,125]. Die Induktion von arteriellen Markern in venösen Endothelzellen wird als ein entscheidender Schritt der tumorassoziierten Angiogenese diskutiert [132,133]. Unter Beachtung der vorliegenden Daten muss bei der systemischen Behandlung von Patienten mit DNMT-Inhibitoren in der Tumorthherapie die Wirkung der Inhibitoren über die Tumorzellen hinaus untersucht werden, um negative Effekte auf gesunde Zellen bzw. Gewebe auszuschließen. In weiterführenden Untersuchungen muss festgestellt werden, ob 5-Aza-dC durch DNA-Hypomethylierung direkt zur Expressionsinduktion dieser Gene geführt hat oder ob andere, durch den DNMT-Inhibitor vermittelte Effekte Ursache der veränderten Genexpressionen waren. Hellebrekers *et al.* zeigten, dass die Reexpression von Genen nach Inkubation mit DNMT-Inhibitoren unabhängig von direkter DNA-Methylierung stattfand [124]. Diese korrelierte jedoch mit einer gesteigerten Histon-Acetylierung sowie einer Zunahme der Methylierung des Lysinrestes 4 im Histon 3 [125]. Ähnliche Ergebnisse wurden für Tumorzellen nach Behandlung mit 5-Aza-dC beschrieben [137,138]. DNMTs haben neben der Methylierung von DNA weitere Funktionen im Rahmen des *gene silencing*. Zum einen scheinen DNMTs direkt als Repressoren der Transkription zu wirken. Zum anderen fungieren sie als Bindungspartner für Histon-Methyltransferasen [139] und HDACs [137]. Fuks *et al.* zeigten in ihrer Arbeit, dass DNMT1 mit HDAC1 in DNA-gebundenen Komplexen interagieren und auf diesem Weg Histon-modifizierende Proteine an die DNA rekrutiert werden können [137]. Die Inhibierung von DNMTs würde demzufolge neben deren methylierungs-abhängigen Eigen-

schaften auch die HDAC-Aktivität in bestimmten DNA-Bereichen verringern. Durch die daraufhin veränderte Chromatinstruktur würde die Transkription in diesen Bereichen begünstigt werden. Um dem nachzugehen, müssten sowohl die Methylierungsmuster von Promotoren als auch die Veränderungen an Histonen durch Hypomethylierung in anschließenden Arbeiten näher betrachtet werden.

In den nächsten Abschnitten werden die Daten bezüglich der *ang-2* Promotorbeschreibung näher betrachtet und diskutiert:

#### **4.2 Bestimmung des Transkriptionsstarts**

Zur Charakterisierung des *ang-2* Promotors war es unerlässlich, den Transkriptionsstartpunkt (TS), die erste transkribierte Base der mRNA, zu bestimmen. Durch den TS wird der *Core*-Promotor definiert, an dem sich der Transkriptionskomplex ausbildet. In der Literatur sind für *ang-2* verschiedene TS veröffentlicht, was eine Vergleichbarkeit der Daten erschwert [118,140,141]. Der in der vorliegenden Untersuchung identifizierte Transkriptionsstartpunkt liegt 312 bp stromaufwärts vom Startcodon der Translation (ATG). Diese Daten stehen in Übereinstimmung mit einer Arbeit von Simon *et al.*, die sowohl einen bereits veröffentlichten TS 308 bp (ref NT\_023736 Homo sapiens chromosome 8 gi: 37552484, NCBI human genome site) als auch einen alternativen TS 343 bp stromaufwärts von ATG bestimmt haben (Abb. 36) [141]. Mezquita *et al.* identifizierten dagegen den Transkriptionsstart 476 bp stromaufwärts von ATG, der somit 165 bp weiter im 5'-Bereich liegt als in dieser Arbeit gezeigt [140]. Die eindeutige Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts war die Grundlage für weitere Untersuchungen bezüglich der Promotorelemente des *ang-2* Gens.



**Abb. 36: Vergleich der publizierten Daten zum *ang-2* Transkriptionsstartpunkt mit den eigenen Arbeiten.**

Die Darstellung erfolgte in Relation zum Translations-Startcodon ATG.<sup>16</sup>

### 4.3 Promotorelemente des *ang-2* Gens

Die Regulation der Gentranskription wird von Elementen innerhalb des Promotors gesteuert, einem Bereich der proximal vom Transkriptionsstart gelegen ist bzw. mit diesem überlappt. Innerhalb des Promotors liegen Sequenzmotive zur Bindung von basalen und spezifischen Transkriptionsfaktoren, die die Transkription des Gens regulieren. Der *core*-Promotor stellt einen kleinen Bereich um den TS herum innerhalb des Promotors dar [142]. An diesen Bereich, der ausreichend ist für die Initiation der Transkription, binden allgemeine Transkriptionsfaktoren (GTF) und die RNA Polymerase II [143]. Der *core*-Promotor wird durch verschiedene Sequenzmotive definiert, zu denen die TATA-Box und die Initiatorregion (*Inr*) gehören. Untersuchungen haben gezeigt, dass beide Bereiche in ihren Funktionen ähnlich sind. Beide führen zu einer akkuraten Initiation der Transkription durch die RNA Polymerase II in Abwesenheit anderer Kontrollelemente. Es gibt die unterschiedlichsten Strukturen von *core*-Promotoren. Für einen funktionellen Promotor sind nicht beide Bereiche notwendig. So verfügt eine Vielzahl von Promotoren über eine TATA-Box, jedoch nicht über ein *Inr*-Element und *vice versa*. Vor allem in Haushaltsgenen können beide Bereiche fehlen.

#### 4.3.1 Die TATA-Box

In der vorliegenden Arbeit wurde eine potentielle TATA-Box durch die Sequenzanalyse mittels der *MatInspector* Software (Genomatix Software GmbH, München) 31 bp stromaufwärts von TS identifiziert. In der aktuellen Literatur bestehen noch immer Unstimmigkeiten bezüglich des Vorhandenseins und der exakten Lage einer TATA-Box im *ang-2* Promotor. Daher war die Identifizierung dieses Promotorelements essentiell. Die in dieser Arbeit identifizierte Lage der TATA-Box stimmt mit Daten von Simon *et al.* überein [141]. Damit verfügt *ang-2* nicht wie bei Hegen *et al.* postuliert über einen TATA-Box freien Promotor [118]. Die Diskrepanz ist auf die unterschiedliche

<sup>16</sup> ATG – Translations-Startcodon  
 5'-UTR – 5'-untranslatierter Bereich (engl. *Untranslated region*)  
 CDS – *Coding DNA sequence*; kodierende DNA-Sequenz

Lokalisation von TS zurückzuführen mit der gearbeitet wurde. Diese Gruppe bezog sich in ihren Arbeiten auf Mezquita *et al.* [140] (Abb. 36).

Unterstützend auf die Wertigkeit der hier identifizierten TATA-Box wirkt sich ebenfalls die Tatsache aus, dass in vielen eukaryotischen Promotoren die TATA-Box 25 bis 30 bp stromaufwärts vom Transkriptionsstart lokalisiert zu sein scheint. Suzuki *et al.* konnten in diesem Zusammenhang in 32% von 1031 untersuchten potentiellen Promotorregionen im Bereich -40 bis -23 relativ zu TS putative TATA-Boxen identifizieren [72]. Die Konsensussequenz zur optimalen Bindung von TBP (*TATA-binding protein*), einer Untereinheit des basalen Transkriptionsfaktors TFIID, lautet 5'-TATATAAG-3' [144]. Daneben existieren jedoch eine Vielzahl von A/T-reichen Sequenzen, die, wenn auch schwächer, mit TBP interagieren [145-147]. Das ist darauf zurückzuführen, dass vermutlich die Bindung von TBP an die kleine Furche der DNA und die daraus resultierende DNA-Biegung nicht direkt von der Basensequenz abhängig ist, sondern vielmehr vom hohen A/T-Gehalt in dieser Region [148]. Die in dieser Arbeit im *ang-2* Promotor identifizierte Sequenz 5'-ATATAAG-3' entspricht weitgehend den Anforderungen an eine funktionelle TATA-Box ( $TATA^A_{T}AA^G_{/A}$ ) [149]. In der Arbeit von Hasegawa *et al.* wurde eine TATA-Box angegeben, die nach unserer Nummerierung innerhalb der 5'-UTR liegt. Da diese Gruppe aber entgegen der allgemeinen Richtlinien bei der Beschreibung von Promotoren den Translationsstartpunkt als Bezug gewählt hat, ist ein Vergleich mit den vorliegenden Daten erschwert und nicht relevant [117].

#### 4.3.2 Die Initiatorregion (*Inr*)

Der überwiegende Teil der transkribierten DNA-Abschnitte beginnt am 5'-Ende im untranslatierten Bereich mit einem Adenin-Nucleotid [143], so wie es für *ang-2* in dieser Arbeit gezeigt wurde (Abb. 23). Dieses Start-Nucleotid liegt oft in einer sehr Pyrimidin-reichen Region, die als Initiator bezeichnet wird und mit dem Transkriptionsstart überlappt. In Promotoren ohne TATA-Box kann durch *Inr* der Translationsstart determiniert werden. Darüber hinaus kann durch *Inr* die Stärke von Promotoren mit TATA-Box erhöht werden, wenn diese ca. 25 bp stromabwärts der TATA-Box gelegen ist [150,151]. *Inr* interagiert mit einer Vielzahl von Faktoren. Es gibt eindeutige Hinweise, dass der basale Transkriptionsfaktor TFIID sequenzspezifisch an *Inr* bindet [152,153]. Es wird angenommen, dass vor allem die Schlüsselkomponenten TAF<sub>II</sub>150 und TAF<sub>II</sub>250 von TFIID mit *Inr* interagieren [154]. Die *Inr*-TFIID-Interaktion ist neben der Sequenz der *Inr*-Region von dem Vorhandensein einer TATA-Box oder von der Bindung des Transkriptionsfaktors Sp1 stromaufwärts von TS abhängig [153]. Die *Inr*-Sequenz ist nur schwach konserviert. Aufgrund der *in vitro* Analyse von 80 zufällig generierten sowie spezifischen Mutanten konnten jedoch die Sequenz-Voraussetzungen für eine funktionelle *Inr*-Region bestimmt werden. Die Relevanz der Konsensus-Sequenz Py Py A(+1) N<sup>T</sup>/<sub>A</sub> Py Py<sup>17</sup> [155,156] wird dadurch unterstrichen, dass bisher bestimmte *Inr*-Elemente diesem Raster entsprechen [155]. Lo und Smale bestätigten in eigenen Arbeiten die Richtigkeit der *Inr*-Konsensus-Sequenz [157].

Kontrovers muss die Basenfolge der potentiellen Initiatorregion im *ang-2* Gen diskutiert werden. Die im Bezug auf TS vorliegende *Inr*-Sequenz 5'-ATA(+1)CTGA-3' entspricht nur bedingt dem Konsens. Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass innerhalb der *Inr*-Sequenz die Basen A an der Position

<sup>17</sup> Pyrimidin – Nukleotide Cytosin (C) und Thymin (T)

+1, T oder A an +3 sowie ein Pyrimidin an -1 am wichtigsten für die Definition der Stärke der *Inr*-Region sind [103,157]. Ob der *ang-2* Promotor ein *Inr*-Element beinhaltet, müsste durch weitere Untersuchungen mit Hilfe von Mutationen in diesem Bereich analysiert werden.

#### 4.4 5'-Deletionsanalyse – Bestimmung des Minimalpromotorbereichs

In der vorliegenden Arbeit wurde nach erfolgreicher Klonierung des *ang-2*(-2702/+324) in den Vektor pGL3 mittels 5'-Deletionsanalyse durch sukzessive Verkürzung des 5'-Bereichs der Abschnitt bestimmt, der essentiell für die basale *ang-2* Transkription war. Erst durch Verkürzung der Sequenz vom 5'-Ende um ca. 2650 bp konnte ein signifikanter Abfall der Transaktivierung im Konstrukt *ang-2*(-41/+324) gemessen werden. Weitere Basenverluste hatten ein Transaktivierungsniveau zur Folge, welches der Kontrolle entsprach (Abb. 26A). Innerhalb der Sequenz -105 bis +51 mussten aufgrund der Datenlage Elemente vermutet werden, die für die basale Transkriptionsregulation verantwortlich waren. Durch Subklonierung der Promotorsequenz *ang-2*(-105/+51) in das heterologe Promotorsystem pT81 [103] wurde bestätigt, dass dieses Element ausreichend ist, um die basale Transkription von *ang-2* auch in einem anderen genetischen Kontext zu aktivieren (Abb. 26C). Hasegawa *et al.* [117] identifizierten im *ang-2* Promotor einen Bereich als kritisch für die Promotoraktivität, der die Sequenz -105 bis +51 einschließt, wodurch die vorliegenden Daten in ihrer Wertigkeit bestätigt werden. Der hier identifizierte Minimalpromotorbereich diente als Grundlage für die Identifizierung von essentiellen Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation von *ang-2* beteiligt sind und in den folgenden Abschnitten diskutiert werden.

#### 4.5 Identifikation von Transkriptionsfaktoren

Durch Sequenzanalyse des Promotorbereichs -105 bis +51 mittels *MatInspector* und dem Programm *AliBaba2.1* wurden potentielle Bindungsmotive für Transkriptionsfaktoren aus der Familie der Sp-Faktoren, GATA und AP-2 $\alpha$  sowie ETS-Faktoren ermittelt. Da die erwähnten Programme auf unterschiedliche Datenbanken zugreifen, war es nicht überraschend, dass die Ergebnisse beider Programme nicht identisch waren. Basierend auf beiden Analysen wurde keine mathematische, sondern eine biologische Teilung der Sequenz -105/+51 in drei Fragmente durchgeführt, die im heterologen System unterschiedlich starke Transaktivierungspotentiale zeigten (Abb. 27). Vor allem der Promotorbereich -105/-56 wies in endothelialen Zellen eine hohe Aktivität gegenüber den anderen Fragmenten auf.

Durch Verdrängungsstudien konnte für *ang-2* die Bindung der Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 an den Promotorbereich -105/+51 gezeigt und somit die Analyse mittels der Programme *MatInspector* und *AliBaba2.1* bestätigt werden. Eine Beteiligung von AP-2 $\alpha$ , GATA sowie Ets konnte durch diese Versuche vorerst ausgeschlossen werden (Abb. 28).

Unter Verwendung von spezifischen Antikörpern gegen die Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 wurde darüber hinaus die Identität der gebildeten DNA-Protein-Komplexe näher untersucht. Aus dem *Supershift*-Muster wird man schlussgefolgert, dass Komplex II aus Sp1-Proteinen besteht (Abb. 29,

Bahn 6). Dagegen führte der Antikörper gegen Sp3 zur Aufhebung der Komplexe I und III (Abb. 29, Bahn 7). Sp3 kommt in mehreren Isoformen vor, wobei größere Varianten mit 110-115 kDa sowie kleinere Isoformen mit einer ungefähren Größe von 60-70 kDa existieren [158-160]. Demzufolge ist im EMSA die Detektion unterschiedlich großer, spezifischer Komplexe für Sp3 möglich.

In den Transfektionsexperimenten mit *Drosophila melanogaster* SL-2 Zellen konnte die Funktionalität der Sp1/Sp3-Bindung an die Region -105/+51 eindeutig gezeigt werden. Die Zellen wurden mit den heterologen *ang-2*-Promotorkonstrukten und den für Sp1 oder Sp3 kodierenden pPac-Sp1/Sp3 Vektoren kotransfiziert. Um zunächst herauszufinden, welchen Effekt ansteigende Konzentrationen der Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 auf die Aktivierung des *ang-2* Minimalpromotors haben, wurden Überexpressionsuntersuchungen in SL-2 Zellen durchgeführt. Diese Zellen verfügen nachweislich über keine Sp-ähnlichen Aktivitäten [104,161]. Somit konnten endogene Sp-Faktoren mit negativem Einfluss auf die Untersuchungen ausgeschlossen werden [116]. Beide Transkriptionsfaktoren führten in der Kotransfektion mit dem Reporterplasmid *ang-2*(-105/+51) zu einer dosisabhängigen Transaktivierung (Abb. 31) und Faktoren waren in der Lage unabhängig voneinander die Transkription zu aktivieren. Dies ist in Übereinstimmung mit der Annahme, dass Sp1 und Sp3 an die gleichen Sequenzen binden [162]. Die gleichzeitige Überexpression von Sp1 und Sp3 hatte in SL-2 Zellen keinen additiven Effekt, so dass kompetitive Aktivierungsmechanismen ausgeschlossen werden können (Daten nicht gezeigt).

Um den Einfluss der Bindungsstellen in einem größeren genetischen Kontext einschätzen zu können, wurden die GC-Boxen im Konstrukt *ang-2*(-2702/+324) mutiert, welches sich aus 2702 bp oberhalb von TS, der 5'-UTR (311 bp) und 13 bp der CDS zusammensetzt. Durch die Mutation von vier Basen wurde die Reportergenaktivität um mehr als 50% reduziert (Abb. 30). Diese Daten zeigen eindeutig, dass Sp-Faktoren an der Regulation der *ang-2* Expression in Endothelzellen beteiligt sind.

Im Promotorbereich -105 bis +51 wurden mittels *MatInspector* drei Konsensussequenzen für Transkriptionsfaktoren der ETS-Familie aufgezeigt, jedoch konnten diese in ersten Kompetitionsstudien nicht bestätigt werden. Da jedoch bereits andere Gruppen in diesem Bereich ETS-Proteine als bedeutungsvoll für die *ang-2* Expression beschrieben haben [117,118,141], wurden Mutationsstudien durchgeführt. Die Mutationen der Bindungsmotive EBS-1<sup>18</sup> bis 3 führten zu einer Reduktion der Reportergenaktivität in Endothelzellen (Abb. 35). ETS-Faktoren scheinen somit auch in dem hier angewandten Zellsystem für die Regulation der *ang-2* Expression relevant zu sein. Bereits Hasegawa *et al.* haben die Bedeutung von Ets-1 für die *ang-2* Expression beschrieben und stellten vor allem EBS-1 (korrespondiert mit EBS-8 bei Hasegawa *et al.*) in den Vordergrund [117]. Diese Daten wurden durch Hegen *et al.* teilweise bestätigt. Sie zeigten zum einen, dass der *ang-2* Promotor speziell in endothelialen, aber nicht in nicht-endothelialen Zellen aktiviert wird. Zum anderen identifizierten sie die Transkriptionsfaktoren Ets-1 und Elf als verantwortlich für die endothelzellspezifische *ang-2* Promotoraktivität [118]. Im Gegensatz zu Hasegawa *et al.* war jedoch nicht EBS-1, sondern EBS-3 (korrespondiert mit EBS-7 bei Hegen *et al.*) in die Regulation der autokrinen *ang-2* Expression involviert. Es wird angenommen, dass die Diskrepanz auf die unterschiedlichen verwendeten Zellsysteme zurückzuführen ist.

<sup>18</sup> EBS – ETS-binding site

Mit der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ETS-Proteine an der expressionellen Regulation von *ang-2* beteiligt sind. Obwohl durch Mutationen der EBS-Motive die transkriptionelle Aktivität signifikant sank, blieb der Beweis für die Relevanz von ETS-Faktoren *in vitro* mittels *Gelshift*-Analysen aus. In den verwendeten Zellsystemen konnte nicht gezeigt werden, ob ETS-Proteine eine spezifische Bindung mit den definierten Promotorbereichen eingehen. Für die Widersprüche mit anderen Arbeiten sind wahrscheinliche methodische Unterschiede verantwortlich. Die *Gelshift*-Analyse wurden in dieser Arbeit im Gegensatz zu anderen Gruppen [117,118] mit Kernprotein-Fractionen und nicht mit Gesamtprotein durchgeführt. Die Kernprotein-Fraktion hat den Vorteil, dass sie Transkriptionsfaktoren in der Form enthält, in der sie letztendlich auch mit der DNA interagieren. Beobachtete DNA-Protein-Komplexe sind somit spezifisch auf Proteine aus dem Zellkern zurückzuführen. Des Weiteren wurden unterschiedliche endotheliale Zellsysteme genutzt. In dieser Arbeit wurde mit HMEC-I Zellen und nicht mit HUVEC Zellen gearbeitet. Sowohl für HMEC-I Zellen als auch für EA.hy926 Zellen, die in Transfektionen eingesetzt wurden, wird jedoch in der Literatur die Expression von ETS-Faktoren beschrieben [163,164]. Ye *et al.* untersuchten die Regulation von *ang-2* im Zusammenhang mit der Kaposi-Sarkom assoziierten Herpesvirusinfektion in HUVEC Zellen an Kernextrakten und konnten im EMSA erst nach Infektion mit dem Virus eine Komplexbildung mit ETS-Proteinen nachweisen [165]. Mit dieser Arbeit konnte sowohl eine eindeutige Beteiligung der Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 an der Regulation der *ang-2* Transkription identifiziert als auch die Relevanz der ETS-Faktoren für *ang-2* belegt werden. Die Bedeutung der einzelnen Faktoren soll diesbezüglich in den nächsten Abschnitten näher diskutiert werden. Neben den proximalen *ang-2* Promotorelementen können auch distale DNA-Abschnitte und daran bindende Faktoren an der *ang-2* Regulation beteiligt sein. Die Untersuchung dieser Bereiche war jedoch nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

#### 4.5.1 Sp1/Sp3

Bisher gab es keine detaillierten Untersuchungen über die Funktionalität von GC-Boxen im *ang-2* Promotor. In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass Sp1<sup>19</sup> und Sp3 durch Bindung an den *ang-2* Minimalpromotor an die Promotorsequenz 5'-GGAGGGCGGAGCAG-3'<sup>20</sup> positiv in die basale transkriptionelle *ang-2* Regulation in Endothelzellen eingreifen.

Zu den häufig vorkommenden Promotorelementen gehören die G-reichen Regionen wie die GC-Box (GGGGCGGGG) oder die mit ihr verwandte GT/CACCC-Box (GGTGTGGGG). Diese Elemente sind an der Expression von vielen ubiquitär vorkommenden Genen, aber auch an der Regulation von gewebsspezifischen und viralen Genen beteiligt [162,167]. Als erstes Mitglied dieser Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die an GC/GT-Boxen binden, wurde Sp1 kloniert [123]. Sp1 gehört zu den Proteinen der Sp/KLF (*Krüppel-like factor*)<sup>21</sup> Transkriptionsfaktor-Familie, die aus der Untergruppe der Sp-Faktoren, welche GC-Boxen bevorzugen sowie der KLF-Familie, die favorisiert an GT-Boxen bindet, besteht [167-169]. Die Vielseitigkeit dieser Transkriptionsfaktoren wird durch Bindungsstellen

<sup>19</sup> Sp1 wurde ursprünglich nach seine Isolierung und Aufreinigung durch Sephacryl- und Phosphozellulose-Säulen benannt [166]. In der Literatur wird es heute jedoch als *specificity protein* (Sp) 1 bezeichnet.

<sup>20</sup> Das zentrale Bindungsmotiv innerhalb der GC-Box ist unterstrichen dargestellt.

<sup>21</sup> Mitglieder der Protein-Familie sind durch eine hoch konservierte C-terminale DBD mit drei Zinkfingern charakterisiert, die der DBD im *Drosophila* Protein *Krüppel* ähnlich ist.



in einer Vielzahl von Genen deutlich, die Funktionen in Zellzykluskontrolle, Differenzierung oder Metabolismus ausüben. Die Interaktion mit der DNA wird durch die hochkonservierte C-terminale DNA-Bindungsdomäne (DBD) vermittelt. Diese zeichnet sich durch die Zink-Finger-Struktur (Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>-Zink-Finger) sowie durch Serin/Threonin- und Glutamin-reiche Domänen im N-terminalen Bereich aus [167,170]. Sp1, Sp3 und Sp4 binden aufgrund der Homologie ihrer DBD mit gleicher Affinität an die klassische GC-Box [106,171]. Sp2 dagegen bindet wegen struktureller Unterschiede bevorzugt an GT-Boxen [158].

Sp1 gilt als potenter Aktivator in der Genregulation. Dabei sind beide glutaminreichen N-terminalen Aktivierungsdomänen starke Interaktionsbereiche. Gill *et al.* konnten zeigen, dass nicht die Häufigkeit an Glutamin innerhalb der Domänen *per se* für die Sp1-abhängige transkriptionelle Aktivierung wichtig sind, sondern vielmehr die auftretenden großen hydrophoben Aminosäuren in diesen Bereichen [172]. Eine kurze C-terminale Domäne ist nach Pascal und Tjian für die synergistische Aktivierung durch Sp1 in Promotoren mit mehreren GC-Boxen verantwortlich [173]. Neben homologen Interaktionen durch DNA-*looping*, die zur Ausbildung von multimeren Komplexen führen [174], kann Sp1 mit nukleären Proteinen verschiedener Klassen, wie z.B. TBP [175] oder TBP-assoziierten Proteinen [176,177] interagieren. In TATA-Box freien Promotoren wird über Sp1 die korrekte Positionierung des allgemeinen Transkriptionsfaktors TFIID zum Transkriptionsstart bewerkstelligt als Voraussetzung für die Transkriptionsinitiation [178,179]. Dieser Mechanismus scheint aber aufgrund der in dieser Arbeit identifizierten TATA-Box für *ang-2* weniger relevant zu sein.

Neben Sp1 wird auch Sp3 ubiquitär exprimiert, welches aufgrund seiner gegensätzlichen transkriptionellen Aktivitäten eine besondere Stellung einnimmt. Obwohl zwischen Sp1 und Sp3 die Sequenzhomologie in der Bindedomäne über 90% beträgt und beide Faktoren um die Bindung an die gleichen GC- und GT-Box Motive konkurrieren [106,157,158], wurde Sp3 ursprünglich als Repressor der Sp1-vermittelten Transaktivierung definiert [106]. Weitere Studien offenbarten jedoch, dass dem Transkriptionsfaktor Sp3 keine generelle Funktion zugeschrieben werden kann. Auf der einen Seite wurde gezeigt, dass Sp3 wie Sp1 als Aktivator agiert [180,181]. Auf der anderen Seite jedoch war Sp3 inaktiv oder wirkte nur als sehr schwacher Aktivator der Transkription [106,108,182]. Es ist offensichtlich, dass über das Verhältnis von Sp1:Sp3 das Ergebnis der Genregulation definiert wird. Dabei haben sowohl der zelluläre Kontext [160,183] als auch die Struktur der Promotoren [184,185] entscheidenden Einfluss auf das Verhalten von Sp3. Allgemein führt Sp3 zu einer Repression der Sp1-abhängigen Transaktivierung in Promotoren mit zwei oder mehr Bindungsstellen für Sp-Faktoren, wie z.B. *c-myc*, *c-src* oder *dhfr* (*dihydrofolate reductase*) [185–187]. Dagegen hat Sp3 keinen Einfluss auf den Sp1-vermittelten Effekt, wenn nur eine Sp-Bindungsstelle im Promotor vorliegt, wie z.B. bei den Genen *tk* (*thymidine kinase*) oder *histone H4* [185]. Dies ist übereinstimmend mit den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen. Über die identifizierte GC-Box I wirkten sowohl Sp1 als auch Sp3, wenn auch schwächer, aktivierend auf den *ang-2* Promotor wie in SL-2 Zellen gezeigt wurde. Die Grundlagen für die sehr unterschiedlichen transkriptionellen Aktivitäten von Sp3 können teilweise durch das Auftreten von mehreren Isoformen des Transkriptionsfaktors [158–160] und durch eine inhibitorische Domäne (ID) erklärt werden. Die inhibitorischen Eigenschaften sind auf einen Bereich zwischen der zweiten Aktivierungsdomäne und der Zink-Finger-Region zurückzuführen. Detaillierte Untersuchungen haben einen Lysin-Rest innerhalb der ID als essentiell für die repressorischen

Aktivitäten identifiziert, dessen Mutation Sp3 von einem schwachen Aktivator oder Repressor zu einem starken Aktivator überführte [188]. Neuere Untersuchungen offenbarten, dass dieser Lysinrest post-translationalen Modifikationen durch SUMO (*small ubiquitin-related modifier*) sowohl *in vivo* als auch *in vitro* unterliegt [159,189,190] und diese mit einer Repression der transkriptionellen Aktivität von Sp3 verbunden ist [191]. Die ID ist in allen Isoformen zu finden, dagegen fehlen den kurzen Isoformen im Vergleich zu den langen die N-terminale Aktivierungsdomäne [160]. Diese Tatsache könnte das schwache Transaktivierungspotential gegenüber den langen Proteinvarianten erklären.

Sp1 und Sp3 werden als konstitutionell exprimierte Transkriptionsfaktoren vor allem mit der Regulation von Haushaltsgenen assoziiert. Es gibt jedoch immer mehr Beweise für die funktionelle Regulation dieser Proteine und deren Beteiligung an zelltypspezifischer Genexpression [169]. Hata *et al.* zeigten in ihren Untersuchungen zu *vegfr-2*, dass dessen endothelspezifische Expression Sp1- und Sp3-abhängig war. Sowohl Sp1 als auch Sp3 Proteine waren in Endothelzellen stärker exprimiert als in nicht-endothelialen Zelllinien [192]. Proteine der Sp-Familie sind an Prozessen wie Differenzierung, Wachstum und Überleben von Zellen unter physiologischen und pathologischen Bedingungen beteiligt [169]. Mit *ang-2* wurde in dieser Arbeit neben *vegfr-1* [193], und *vegf-A* [194] ein weiteres durch Sp1 reguliertes Gen identifiziert, das im Zentrum der Angiogenese steht. Darüber hinaus wurde von verschiedenen Gruppen gezeigt, dass Sp1 ein Transkriptionsfaktor ist, der im Zusammenhang mit der Tumorgenese und wachstumsregulierenden Genen kritisch betrachtet wird. Dazu gehören der *epidermal growth factor* (EGF)-Rezeptor [195] und der *transforming growth factor* (TGF)- $\alpha$  [196] als Mediatoren der Zellproliferation und des Zellwachstums. In Bezug auf Zellüberleben und der Vermittlung von Apoptose-Resistenz sind *bcl-2* [197] und *survivin* [198] zu nennen. In verschiedenen soliden Tumoren wie z.B. dem Magen-, Kolorektal- oder Pankreaskarzinom [199-202] wurde eine verstärkte Expression von Sp-Faktoren nachgewiesen. Yuan *et al.* stellten eine direkte Korrelation zwischen der *sp1* Expression und der Gefäßdichte beim Pankreaskarzinom auf [202]. Die Inhibierung von Sp1 führte zu einer Tumorsuppression des humanen Pankreaskarzinoms im *in vivo* Mausmodell, begleitet von einer verminderten Expression von Schlüsselgenen der Angiogenese [202]. Klinische Studien weisen auf eine Korrelation zwischen der Überexpression von *sp1* und der schlechten Prognose für das Magenkarzinom hin [199,200] und haben Sp1 als unabhängigen prognostischen Marker für das humane Magenkarzinom identifiziert [199]. Zudem haben Etoh *et al.* für das Magenkarzinom eine Verschiebung des Verhältnisses von Ang-1:Ang-2 zugunsten von Ang-2 beschrieben, die mit einer schlechteren Prognose und einer verstärkten Vaskularisation der Tumoren einherging [203]. Diese Daten beschreiben in Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit dargelegten Mechanismen zur *ang-2* Regulation eine mögliche biologische Verbindung zwischen Sp1 und Ang-2.

#### 4.5.2 ETS-Transkriptionsfaktoren

Die Familie der ETS-Faktoren<sup>22</sup> wird durch ihre konservierte DNA-Bindungsdomäne definiert, die ETS-Domäne [204], welche ein *helix-turn-helix* Motiv ausbildet [205]. Über diese Domäne erfolgt die Bindung an purinreiche DNA-Sequenzen der Promotoren von Zielgenen, die innerhalb der 10 bp umfassenden Erkennungssequenz das zentrale Motiv GGAA/T aufweisen [206]. Dem

<sup>22</sup> ETS leitet sich von *Avian Erythroblastosis E26 transformation specific sequence* ab [204].

Transkriptionsfaktor Ets-1 kommt während der Angiogenese eine entscheidende Rolle zu [207]. *In vivo* wird *ets-1* in vaskulären Endothelzellen während der Angiogenese sowohl in physiologischen Vorgängen wie der embryonalen Blutgefäßbildung [208] als auch in pathologischen Situationen wie der Vaskularisierung von Tumoren [209] verstärkt exprimiert. Nach Abschluss der Gefäßbildung wird die *ets-1* Expression wieder herunterreguliert [210,211]. Durch Stimulation humaner Endothelzellen mit angiogenen Wachstumsfaktoren wie VEGF und FGF-2 wird die *ets-1* Expression induziert [212,213]. Bindungsmotive für Ets-1 wurden in verschiedenen Promotoren von Genen identifiziert, die mit der angiogenen Kaskade assoziiert werden. Dazu gehören neben dem *ang-2* [117,118,141,165], Gene für Wachstumsrezeptoren wie *vegfr-1* [214], *vegfr-2*, *tie-1* [215] und *tie-2* [216] sowie für Matrix-degradierende Proteasen wie Matrix-Metalloproteinasen [217] und deren Inhibitoren [218]. Ets-1 interagiert funktionell mit einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren und anderen Proteinen. Eine Kooperation zwischen Ets-1 und Sp1 wurde bereits in einigen Promotoren nachgewiesen. So wird zum Beispiel über Ets-1/Sp1 die *mrg1* Expression in Fibroblasten [219], die *glycoprotein IIb* Genexpression in Megakaryocyten [220] und die Expression von *fasL* (*fas-ligand*) in vaskulären glatten Muskelzellen [221] aktiviert.

Eine *ets-1* Expression wurde in verschiedenen Karzinomen, Sarkomen und Astrozytomen detektiert. Dabei korreliert die Höhe der Expression mit dem Grad der Invasion und dem Grad der Metastasierung [222]. Eine hohe *ets-1* Expression wird bei dem Mamma-, Ovarial- und Zervixkarzinom mit einer schlechteren Prognose für den Patienten assoziiert [223,224].

#### 4.6 Angiopoietin-2 – Angriffspunkt für die antiangiogene Tumorthérapien

Angiogenese wurde schon vor mehreren Jahrzehnten als ein begrenzender Schritt in der Tumorentstehung beschrieben [225]. Hanahan und Weinberg postulierten, dass Zellen während der Tumorentstehung wichtige physiologische Änderungen erfahren, die das maligne Wachstum fördern [52]. Zu den von ihnen beschriebenen sechs Charakteristika gehört vor allem auch die Etablierung einer autarken Blutversorgung. Die intratumorale Gefäßdichte wird als ein wichtiger und unabhängiger prognostischer Marker für die Metastasierung und Überlebenschance von Patienten mit unterschiedlichen Tumoren, wie z.B. Mamma-, Zervix-, Colorektal- oder Lungenkarzinomen verwendet [226-229]. Eine Ausrichtung der antiangiogenen Therapie auf das aktivierte Endothel hat gegenüber Therapien mit Tumorzellen als Ziel einige Vorteile: Resistenzen gegenüber Medikamenten sind ein geringeres Problem, weil Endothelzellen genetisch relativ stabile und homogene Zellen sind, die nur selten Spontanmutationen erfahren. Ihre Proliferationsrate ist gegenüber Tumorzellen ca. 50 Mal geringer und sie exprimieren spezifische Marker wie Tie- oder VEGF-Rezeptoren [230]. Das aktivierte Endothel ist somit ein mit Tumorzellen vergleichbar gutes Ziel für eine zielgerichtete antiangiogene Therapie. Darüber hinaus kann durch die Zerstörung einiger weniger Tumorgefäße das Wachstum vieler Tumorzellen beeinflusst werden [231]. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit die Untersuchungen bezüglich der *ang-2* Regulation hauptsächlich an Endothelzellen durchgeführt.

Konventionelle Tumorthérapien sind häufig durch geringe Erfolgsraten und toxische Nebenwirkungen gekennzeichnet. Daher wird versucht auf pharmakologischem Weg Therapien zu entwickeln, die auf Moleküle ausgerichtet sind, welche spezifisch für die Tumorgenese sind. VEGF ist eines der ersten

Signalmoleküle, welches die Kaskade der Tumorangiogenese stimuliert und dessen Inhibition stellt bisher die am besten validierte Methode zur antiangiogenen Therapie dar [21,232]. Daneben existiert eine Vielzahl von Molekülen, die in den *angiogenic switch* eingreifen. Zu diesen gehört unter anderem Ang-2. *In vitro* und *in vivo* Versuche haben gezeigt, dass Ang-2 im differenzierten Endothel in Abwesenheit von VEGF destabilisierend wirkt und zu einer Gefäßregression führt. Der destabilisierende Ang-2 Effekt in Gegenwart hoher VEGF-Konzentration hingegen fördert die angiogene Wirkung [53,233]. Auf Basis von histopathologischen Befunden [234] und einem Maus-Xenotransplantat-Modell [58], in dem *ang-2* überexprimiert wurde, konnte die destabilisierende Wirkung von Ang-2 auf die Vaskulatur im Kontext der tumorassoziierten Angiogenese postuliert werden. Die ektopische *ang-2* Expression im Tumormodell führte sowohl zur Stimulation als auch zur Inhibition des Tumorwachstums und der Tumorangiogenese und zeigt die Widersprüche bezüglich der Ang-2 Funktion auf [58–60]. Nasarre *et al.* zeigten in Mausmodellen, dass Ang-2 während der frühen Stadien der Tumorentwicklung Einfluss auf das Tumorwachstum hat, für spätere Stadien der Tumorprogression jedoch entbehrlich ist [235]. Ang-2 ist vor diesem Hintergrund für die initiale Tumorgenese notwendig, noch bevor durch VEGF induziertes Gefäßwachstum einsetzt. Diese Daten unterstreichen die Annahme, dass Ang-2 Inhibierung zu einem anti-tumorigenen Effekt führen kann, weisen aber gleichzeitig auf das begrenzte zeitliche Fenster während der Tumorentwicklung hin.

White *et al.* konnten durch lokale Applikation von Ang-2 spezifischen RNA-Aptameren<sup>23</sup> keine vollständige angiogene Inhibition in einem Ratten-Corneal Pocket-Modell erzielen [237]. Versuche mit löslichem Tie-2, an den Ang-2 bindet, vermittelten ebenfalls eine Unterdrückung des Tumorwachstums und der -angiogenese. Jedoch konnten diese Effekte nicht direkt einer Ang-2 Inhibition zugeordnet werden [238,239]. Dagegen zeigte die Gruppe um Jonathan Oliner mittels Ang-2 selektiven Fc-konjugierter Peptid-Fusionsproteinen und Antikörpern die spezifische Inaktivierung endogenen Ang-2, welche zur Inhibierung der Tumorangiogenese in Mäusen und der Kornealangiogenese in Ratten führte. Durch diese Versuche wurde die angiogene Funktion von Ang-2 bestätigt [67]. Darüber hinaus war in einer Subpopulation von Tieren mit Tumoren nach langfristiger anti-Ang-2 Therapie kein Resttumor mehr messbar [67]. Durch Modifikation des Ang-2 spezifischen RNA-Aptamers von White *et al.* [237], konnten Sarraf-Yazdi und Mitarbeiter das Aptamer systemisch applizieren und sowohl eine Reduktion der Tumorangiogenese als auch des -wachstums im murinen Colontumor-Modell beobachten [240]. Die Ang-2 Inhibition war jedoch wiederum unvollständig [240].

Die selektive Inhibierung von *ang-2* ist basierend auf *in vitro* und *in vivo* Daten ein vielversprechender Ansatz in der antiangiogenen Therapie und könnte neben Tumorerkrankungen auch bei anderen mit Angiogenese einhergehenden Krankheitsbildern in der Therapie Verwendung finden, z.B. bei der Diabetischen Retinopathie und der Rheumatoiden Arthritis [241,242]. Über die bisherigen Ansätze wurden jedoch noch keine befriedigenden Ergebnisse erzielt, so dass neue Wege der *ang-2* Inhibition gefunden werden müssen. Die mit dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse zur *ang-2* Transkriptionsregulation sollten mögliche Ansätze für eine auf *ang-2* ausgerichtete Therapie liefern. Denkbare Angriffspunkte sollen anschließend diskutiert werden.

<sup>23</sup> Aptamere sind kurze einzelsträngige DNA- oder RNA-Oligonukleotide (25–70 Basen), die ein spezifisches Molekül über ihre 3D-Struktur binden können [236].

#### 4.6.1 Sp- und ETS-Transkriptionsfaktoren als potentielle Ziele in der Ang-2 spezifischen antiangiogenen Therapie

Die quantitative und qualitative Fehlregulation von molekularen Mechanismen in normalen Geweben resultiert in malignen Prozessen, welche die Karzinogenese begünstigen. Störungen in transkriptionellen regulatorischen Strukturen und/oder Mechanismen sind eindeutig an diesen Vorgängen beteiligt, was durch die Anzahl der Transkriptionsfaktoren belegt wird, die durch Proto-Onkogene oder Tumorsuppressorgene kodiert werden. Bisher war die Therapie in der Tumorbildung vor allem auf Rezeptoren an der Zelloberfläche ausgerichtet, da diese für Medikamente am leichtesten zugänglich sind, wohingegen Agenzien, die auf der transkriptionellen Ebene wirken die Zellmembran passieren müssen. Transkriptionsfaktoren sind aufgrund ihrer Struktur trotzdem ein potentielles Angriffsziel für niedermolekulare Verbindungen, die über die spezifische Interaktion mit deren DNA-Bindungsdomänen oder Aktivierungsdomänen wirken könnten [243]. Der Eingriff in die *ang-2* Expression über die Modulation der beteiligten Transkriptionsfaktoren wie Sp1 und Sp3 sowie Ets-1 stellt einen interessanten Ansatz für die direkte *ang-2* Inhibition dar.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde eindeutig gezeigt, dass Sp1 und Sp3 an der Regulation der *ang-2* Expression beteiligt sind. Aufgrund ihrer Funktion in der Regulation essentieller Gene zur Steuerung von Wachstum, Invasion und Angiogenese rücken sie ins Blickfeld therapeutischer Studien. Erste Untersuchungen zeigten, dass durch siRNA und Antisense-Oligonukleotide eine Interferenz mit Sp1/Sp3 möglich ist. Mit dem Bisanthracyclin WP631 ist ein potenter niedermolekularer Inhibitor vorhanden, der die Sp1-vermittelte Transkription durch kompetitive Bindung an DNA-Konsensussequenzen reduziert [244]. Wei *et al.* konnten in einem murinen orthotopen Pankreaskarzinom Modell durch Applikation von Celecoxib, einem selektiven Cox-2 Inhibitor, sowohl das Tumorstadium als auch die Metastasierung inhibieren [245]. Der zugrunde liegende Mechanismus basierte auf einer Suppression der Sp1-Aktivität, die mit einem verminderten Sp1-Proteinlevel und einer Abnahme an phosphoryliertem Sp1 korrelierte [245], welches über eine reduzierte Aktivität gegenüber der dephosphorylierten Form verfügt [173]. Über Mithramycin A [246] und der mit dieser Substanz verbundenen Suppression der *sp1* Expression und dessen Zielgen *vegf*, konnte im murinen Magenkarzinom-Modell die Angiogenese, das Wachstum und die Metastasierung von Tumoren inhibiert werden [247]. Die Auswirkungen dieser Behandlungen wurden bisher nur in Bezug auf die *vegf*-Expression validiert, welches in seinem Promotor über Sp1 Bindungsstellen verfügt [248] wie auch in früheren Arbeiten unserer Gruppe gezeigt wurde [194]. Erste Hinweise, dass diese Behandlung auch Auswirkungen auf die *ang-2* Transkription haben könnte, legen die hier ermittelten Daten aufgrund der Identifizierung des Sp1 Faktors nahe und machen weitere Untersuchungen lohnenswert. Vor allem mit dem Wissen, dass Ang-2 unter bestimmten Bedingungen unabhängig von VEGF angiostatisch wirken kann [249], ist eine Validierung von Interesse.

*Ets-1* stellt ein weiteres interessantes Ziel für die Tumorthherapie aufgrund seiner spezifischen Expression in aktivierten Endothelzellen während der Angiogenese dar [208], die mit der *ang-2* Expression korreliert. Über Ets-1 wird wahrscheinlich die endothelzellspezifische *ang-2* Expression reguliert [118,141]. Putative ETS-Bindungsselemente wurden auch in dieser Arbeit für *ang-2* identifiziert. Iwasaka *et al.* [213] und Chen *et al.* [250] erzielten durch den Einsatz von Antisense-Oligonukleotiden über kompetitive Bindungsvorgänge an der DNA eine Hemmung der *ets-1* Expression, welche zur

Verringerung der Proliferationsrate und Migration von Endothelzellen führte. Wernert *et al.* postulierten, dass neben Antisense-Strategien auch die Verwendung von niedermolekularen Verbindungen, welche die *ets-1* Expression hemmen, Erfolg versprechend in der antiangiogenen Therapie sein könnte [251]. Sie konnten zeigen, dass der Pilzmetabolit Fumagillin [252] *in vitro* die Proliferation und *in vivo* die Angiogenese über die Modulation der *ets-1* Expression inhibiert [251]. Ob die Hemmung von *ets-1* und die resultierenden Effekte auf Endothelzellen auch über eine Inhibition der *ang-2* Expression erfolgten, wurde bisher nicht untersucht. Aufgrund der identifizierten Bindungsstellen im *ang-2* Minimalpromotor liegt diese Vermutung jedoch nahe und sollte weiter untersucht werden.

Die Fokussierung einer zielgerichteten Therapie auf die Beeinflussung von Transkriptionsfaktoren ist vielversprechend, macht jedoch Überlegungen bezüglich (i) der Selektivität, (ii) Spezifität sowie (iii) der differentiellen Sensitivität notwendig [243]. Um ernsthafte Nebenwirkungen einer genomweiten Inhibition eines Transkriptionsfaktors auszuschließen, muss eine tumorgerichtete Applikation sowie eine tumorspezifische Aktivierung sichergestellt werden. Aufgrund der strukturellen Gemeinsamkeiten innerhalb einer Transkriptionsfaktorfamilie und den oft sehr unterschiedlichen Funktionen der einzelnen Proteine, sind für effektive Behandlungen Systeme notwendig, die zwischen den verschiedenen Faktoren einer Familie unterscheiden können. Letztendlich werden durch Unterschiede zwischen Tumor- und Normalgewebe Störungen und Divergenz in zeitlichen Mustern und Konzentrationsgradienten wiedergegeben, die Beachtung bezüglich der differentiellen Sensitivität bedürfen. Trotz dieser Hürden, die zu nehmen sind, stellen Transkriptionsfaktoren sowie die Transkriptionsmaschinerie neuartige Ziele in der Tumorthherapie dar, die mit wachsendem Verständnis und Wissen um ihre Rolle in der Kanzerogenese immer mehr an Aufmerksamkeit gewinnen.

## Literatur

- [1] Pardanaud, L.; Altmann, C.; Kitos, P.; Dieterlen-Lievre, F. und Buck, C. A. (1987): Vasculogenesis in the early quail blastodisc as studied with a monoclonal antibody recognizing endothelial cells, *Development* 100 [2], pp. 339-349. URL: <http://dev.biologists.org/cgi/content/abstract/100/2/339>
- [2] Risau, W. und Flamme, I. (1995): Vasculogenesis, *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 11 [1], pp. 73-91. URL: <http://arjournals.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.cb.11.110195.000445>
- [3] Risau, Werner (1997): Mechanisms of angiogenesis, *Nature* 386 [6626], pp. 671-674. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/386671a0>
- [4] Baumgartner, I und Isner, J. M. (1998): Stimulation of peripheral angiogenesis by vascular endothelial growth factor (VEGF), *Vasa* 27 [4], pp. 201-206.
- [5] Losordo, Douglas W.; Vale, Peter R.; Symes, James F.; Dunnington, Cheryl H.; Esakof, Darryl D.; Maysky, Michael; Ashare, Alan B.; Lathi, Kishor und Isner, Jeffrey M. (1998): Gene Therapy for Myocardial Angiogenesis : Initial Clinical Results With Direct Myocardial Injection of phVEGF165 as Sole Therapy for Myocardial Ischemia, *Circulation* 98 [25], pp. 2800-2804. URL: <http://circ.ahajournals.org/cgi/content/abstract/98/25/2800>
- [6] Patan, Sybill; Haenni, Beat und Burri, Peter H. (1996): Implementation of Intussusceptive Microvascular Growth in the Chicken Chorioallantoic Membrane (CAM):: 1. Pillar Formation by Folding of the Capillary Wall, *Microvascular Research* 51 [1], pp. 80-98. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WN8-45MGV7M-27/2/866515e43e9db180d1efc7fa94674d07>
- [7] Djonov, V.; Schmid, M.; Tschanz, S. A. und Burri, P. H. (2000): Intussusceptive Angiogenesis : Its Role in Embryonic Vascular Network Formation, *Circulation Research* 86 [3], pp. 286-292. URL: <http://circres.ahajournals.org/cgi/content/abstract/86/3/286>
- [8] Burri, P. H.; Hlushchuk, R. und Djonov, V. (2004): Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance, *Dev.Dyn.* 231 [3], pp. 474-488. URL: PM:15376313
- [9] Hanahan, Douglas und Folkman, Judah (1996): Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis, *Cell* 86 [3], pp. 353-364. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WSN-4195BXX-4/2/75a814d820b32a708cb623dfbafba3ee>
- [10] Bergers, Gabriele und Benjamin, Laura E. (2003): Tumorigenesis and the angiogenic switch, *Nature Reviews Cancer* 3 [6], pp. 401-410. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc1093>
- [11] Kimura, Hideo; Weisz, Alessandro; Kurashima, Yukiko; Hashimoto, Kouichi; Ogura, Tsutomu; D'Acquisto, Fulvio; Addeo, Raffaello; Makuuchi, Masatoshi und Esumi, Hiroyasu (2000): Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide, *Blood* 95 [1], pp. 189-197. URL: <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/cgi/content/abstract/bloodjournal;95/1/189>
- [12] Moses, Marsha A. (1997): The Regulation of Neovascularization by Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors, *Stem Cells* 15 [3], pp. 180-189. URL: <http://stemcells.alphamedpress.org/cgi/content/abstract/15/3/180>
- [13] Brew, Keith; Dinakarpanian, Deendayal und Nagase, Hideaki (2000): Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1477 [1-2], pp. 267-283. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T21-3YRVH2N-R/2/e021e1e4ae615046b342a568e6ff6755>
- [14] Suri, C.; Jones, P. F.; Patan, S.; Bartunkova, S.; Maisonpierre, P. C.; Davis, S.; Sato, T. N. und Yancopoulos, G. D. (1996): Requisite role of Angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis, *Cell* 87 [7], pp. 1171-1180. URL: ISI:A1996WA54100006
- [15] Kim, Injune; Kim, Hwan Gyu; Moon, Sang Ok; Chae, Soo Wan; So, June No; Koh, Keum Nim; Ahn, Byung Cook und Koh, Gou Young (2000): Angiopoietin-1 Induces Endothelial Cell Sprouting Through the Activation of Focal Adhesion Kinase and Plasmid Secretion, *Circulation Research* 86 [9], pp. 952-959. URL: <http://circres.ahajournals.org/cgi/content/abstract/86/9/952>
- [16] Benjamin, L. E.; Hemo, I. und Keshet, E. (1998): A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF, *Development* 125 [9], pp. 1591-1598. URL: <http://dev.biologists.org/cgi/content/abstract/125/9/1591>
- [17] Carmeliet, P. (2003): Angiogenesis in health and disease, *Nature Medicine* 9 [6], pp. 653-660. URL: ISI:000183444100019
- [18] Carmeliet, Peter; Lampugnani, Maria Grazia; Moons, Lieve; Breviario, Ferruccio; Compernelle, Veerle; Bono, Françoise; Balconi, Giovanna; Spagnuolo, Raffaella; Oosthuysen, Bert; Dewerchin, Mieke; Zanetti, Adriana; Angellilo, Anne; Mattot, Virginie; Nuyens, Dieter; Lutgens, Esther; Clotman, Frederic; de Ruiter, Marco C.; Gittenberger-de Groot, Adriana; Poelmann, Rob; Lupu, Florea; Herbert, Jean Marc; Collen, Dösiro und Dejana, Elizabetta (1999): Targeted Deficiency or Cytosolic Truncation of the VE-cadherin Gene in Mice Impairs VEGF-Mediated Endothelial Survival and Angiogenesis, *Cell* 98 [2], pp. 147-157. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WSN-4194PJT-5/2/08af03acff84f659e1610375e5b9e63a>
- [19] Jones, Nina; Master, Zubin; Jones, Jamie; Bouchard, Denis; Gunji, Yuji; Sasaki, Hiroki; Daly, Roger; Alitalo, Kari und Dumont, Daniel J. (1999): Identification of Tek/Tie2 Binding Partners. Binding to multifunctional Docking Site Mediates Cell Survival and Migration, *Journal of Biological Chemistry* 274 [43], pp. 30896-30905. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/274/43/30896>

- [20] Holash, J.; Wiegand, S. J. und Yancopoulos, G. D. (1999): New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF, *Oncogene* 18 [38], pp. 5356-5362. URL: ISI:000082808400015
- [21] Yancopoulos, G. D.; Davis, S.; Gale, N. W.; Rudge, J. S.; Wiegand, S. J. und Holash, J. (2000): Vascular-specific growth factors and blood vessel formation, *Nature* 407 [6801], pp. 242-248. URL: ISI:000089241000060
- [22] Jones, N.; Iljin, K.; Dumont, D. J. und Alitalo, K. (2001): Tie receptors: New modulators of angiogenic and lymphangiogenic responses, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2 [4], pp. 257-267. URL: ISI:000167883300015
- [23] Davis, S.; Aldrich, T. H.; Jones, P. F.; Acheson, A.; Compton, D. L.; Jain, V.; Ryan, T. E.; Bruno, J.; Radziejewski, C.; Maisonpierre, P. C. und Yancopoulos, G. D. (1996): Isolation of Angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning, *Cell* 87 [7], pp. 1161-1169. URL: ISI:A1996WA54100005
- [24] Maisonpierre, P. C.; Suri, C.; Jones, P. F.; Bartunkova, S.; Wiegand, S.; Radziejewski, C.; Compton, D.; McClain, J.; Aldrich, T. H.; Papadopoulos, N.; Daly, T. J.; Davis, S.; Sato, T. N. und Yancopoulos, G. D. (1997): Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis, *Science* 277 [5322], pp. 55-60. URL: ISI:A1997XJ41800036
- [25] Valenzuela, David M.; Griffiths, Jennifer A.; Rojas, Jose; Aldrich, Thomas H.; Jones, Pamela F.; Zhou, Hao; McClain, Joyce; Copeland, Neal G.; Gilbert, Debra J.; Jenkins, Nancy A.; Huang, Tammy; Papadopoulos, Nick; Maisonpierre, Peter C.; Davis, Samuel und Yancopoulos, George D. (1999): Angiopoietins 3 and 4: Diverging gene counterparts in mice and humans, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 [5], pp. 1904-1909. URL: <http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/96/5/1904>
- [26] Partanen, J.; Armstrong, E.; Makela, T. P.; Korhonen, J.; Sandberg, M.; Renkonen, R.; Knuttila, S.; Huebner, K. und Alitalo, K. (1992): A novel endothelial cell surface receptor tyrosine kinase with extracellular epidermal growth factor homology domains, *Molecular and Cellular Biology* 12 [4], pp. 1698-1707. URL: <http://mcb.asm.org/cgi/content/abstract/12/4/1698>
- [27] Sato, T. N.; Qin, Y.; Kozak, C. A. und Audus, K. L. (1993): tie-1 and tie-2 Define Another Class of Putative Receptor Tyrosine Kinase Genes Expressed in Early Embryonic Vascular System, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90 [20], pp. 9355-9358. URL: <http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/90/20/9355>
- [28] Wong, Adrienne L.; Haroon, Zishan A.; Werner, Sabine; Dewhirst, Mark W.; Greenberg, Charles S. und Peters, Kevin G. (1997): Tie2 Expression and Phosphorylation in Angiogenic and Quiescent Adult Tissues, *Circulation Research* 81 [4], pp. 567-574. URL: <http://circres.ahajournals.org/cgi/content/abstract/81/4/567>
- [29] Sato, Thomas N.; Tozawa, Yuzuru; Deutsch, Urban; Wolburg-Buchholz, Karen; Fujiwara, Yuko; Gendron-Maguire, Maureen; Gridley, Thomas; Wolburg, Hartwig; Risau, Werner und Qin, Ying (1995): Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation, *Nature* 376 [6535], pp. 70-74. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/376070a0>
- [30] Dumont, D. J.; Gradwohl, G.; Fong, G. H.; Puri, M. C.; Gertsenstein, M.; Auerbach, A. und Breitman, M. L. (1994): Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo, *Genes and Development* 8 [16], pp. 1897-1909. URL: <http://www.genesdev.org/cgi/content/abstract/8/16/1897>
- [31] Kim, Injune; Kim, Hwan Gyu; So, June No; Kim, Joo Heon; Kwak, Hee Jin und Koh, Gou Young (2000): Angiopoietin-1 Regulates Endothelial Cell Survival Through the Phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt Signal Transduction Pathway, *Circulation Research* 86 [1], pp. 24-29. URL: <http://circres.ahajournals.org/cgi/content/abstract/86/1/24>
- [32] Papapetropoulos, Andreas; Fulton, David; Mahboubi, Keyvan; Kalb, Robert G.; O'Connor, Daniel S.; Li, Fengzhi; Altieri, Dario C. und Sessa, William C. (2000): Angiopoietin-1 Inhibits Endothelial Cell Apoptosis via the Akt/Survivin Pathway, *Journal of Biological Chemistry* 275 [13], pp. 9102-9105. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/275/13/9102>
- [33] Jones, N. und Dumont, D. J. (1998): The Tek/Tie2 receptor signals through a novel Dok-related docking protein, Dok-R., *Oncogene* 17 [9], pp. 1097-1108.
- [34] Partanen, J.; Puri, M. C.; Schwartz, L.; Fischer, K. D.; Bernstein, A. und Rossant, J. (1996): Cell autonomous functions of the receptor tyrosine kinase TIE in a late phase of angiogenic capillary growth and endothelial cell survival during murine development, *Development* 122 [10], pp. 3013-3021. URL: <http://dev.biologists.org/cgi/content/abstract/122/10/3013>
- [35] Puri, M. C.; Partanen, J.; Rossant, J. und Bernstein, A. (1999): Interaction of the TEK and TIE receptor tyrosine kinases during cardiovascular development, *Development* 126 [20], pp. 4569-4580. URL: <http://dev.biologists.org/cgi/content/abstract/126/20/4569>
- [36] Davis, S.; Papadopoulos, N.; Aldrich, T. H.; Maisonpierre, P. C.; Huang, T.; Kovac, L.; Xu, A.; Leidich, R.; Radziejewska, E.; Rafique, A.; Goldberg, J.; Jain, V.; Bailey, K.; Karow, M.; Fandl, J.; Samuelsson, S. J.; Ioffe, E.; Rudge, J. S.; Daly, T. J.; Radziejewski, C. und Yancopoulos, G. D. (2003): Angiopoietins have distinct modular domains essential for receptor binding, dimerization and superclustering, *Nature Structural Biology* 10 [1], pp. 38-44. URL: ISI:000180216100012
- [37] Koh, G. Y.; Kim, I.; Kwak, H. J.; Yun, M. J. und Leem, J. C. (2002): Biomedical significance of endothelial cell specific growth factor, angiopoietin., *Experimental and Molecular Medicine*, pp. 1-11.
- [38] Procopio, William N.; Pelavin, Paul I.; Lee, William M. F. und Yeilding, Newman M. (1999): Angiopoietin-1 and -2 Coiled Coil Domains Mediate Distinct Homo-oligomerization Patterns, but Fibrinogen-like Domains Mediate Ligand Activity, *Journal of Biological Chemistry* 274 [42], pp. 30196-30201. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/274/42/30196>



- [39] Kim, Kyung Tae; Choi, Han Ho; Steinmetz, Michel O.; Maco, Bohumil; Kammerer, Richard A.; Ahn, So Young; Kim, Hak Zoo; Lee, Gyun Min und Koh, Gou Young (2005): Oligomerization and Multimerization Are Critical for Angiopoietin-1 to Bind and Phosphorylate Tie2, *Journal of Biological Chemistry* 280 [20], pp. 20126-20131. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/280/20/20126>
- [40] Kim, Injune; Kim, Ji-Hye; Moon, Sank-Oka; Kwak, Hee Jin; Kim, Nam-Gyun und Koh, Gou Young (2000): Angiopoietin-2 at high concentration can enhance endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway., *Oncogene* 19 [39], pp. 4549-4552.
- [41] Gale, Nicholas W.; Thurston, Gavin; Hackett, Sean F.; Renard, Roumiana; Wang, Quan; McClain, Joyce; Martin, Cliff; Witte, Charles; Witte, Marlys H.; Jackson, David; Suri, Chitra; Campochiaro, Peter A.; Wiegand, Stanley J. und Yancopoulos, George D. (2002): Angiopoietin-2 Is Required for Postnatal Angiogenesis and Lymphatic Patterning, and Only the Latter Role Is Rescued by Angiopoietin-1, *Developmental Cell* 3 [3], pp. 411-423. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WW3-46X2KN2-G/2/75f3ff49dfa15f1454ad0c45a4d9875b>
- [42] Fiedler, U.; Scharpfenecker, M.; Koidl, S.; Hegen, A.; Grunow, V.; Schmidt, J. M.; Kriz, W.; Thurston, G. und Augustin, H. G. (2004): The Tie-2 ligand angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Paladebodies, *Blood* 103 [11], pp. 4150-4156. URL: ISI:000221657600031
- [43] Visconti, Richard P.; Richardson, Charlene D. und Sato, Thomas N. (2002): Orchestration of angiogenesis and arteriovenous contribution by angiopoietins and vascular endothelial growth factor (VEGF), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 [12], pp. 8219-8224. URL: <http://www.pnas.org/content/99/12/8219.abstract>
- [44] Hanahan, D. (1997): Signaling vascular morphogenesis and maintenance, *Science* 277 [5322], pp. 48-50. URL: PM:9229772
- [45] Zakrzewicz, A.; Secomb, T. W. und Pries, A. R. (2002): Angioadaptation: Keeping the vascular system in shape, *News in Physiological Sciences* 17, pp. 197-201. URL: ISI:000178425900005
- [46] Klagsbrun, M. und D'Amore, P. A. (1991): Regulators of Angiogenesis, *Annual Review of Physiology* 53 [1], pp. 217-239. URL: <http://arjournals.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.ph.53.030191.001245>
- [47] Tait, C. R. und Jones, P. (2004): Angiopoietins in tumours: the angiogenic switch., *Journal of Pathology* 2004 [1], pp. 1-10.
- [48] Coussens, Lisa M.; Raymond, Wilfred W.; Bergers, Gabriele; Laig-Webster, Marion; Behrendtsen, Ole; Werb, Zena; Caughey, George H. und Hanahan, Douglas (1999): Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis, *Genes & Development* 13 [11], pp. 1382-1397. URL: <http://genesdev.cshlp.org/content/13/11/1382.abstract>
- [49] Weber, A. J. und De Bandt, M. (2000): Angiogenesis: general mechanisms and implications for rheumatoid arthritis., *Joint Bone Spine* 67 [5], pp. 366-383.
- [50] Frank, R. N. (2004): Diabetic retinopathy, *New England Journal of Medicine* 350 [1], pp. 48-58. URL: ISI:000187659900009
- [51] Folkman, Judah (2002): Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis., *Semin Oncol* 26 [6 Suppl 16], pp. 15-18.
- [52] Hanahan, Douglas und Weinberg, Robert A. (2000): The Hallmarks of Cancer, *Cell* 100 [1], pp. 57-70. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WSN-4195FC1-5/2/aef1d48431eadea4567b697b1fee0514>
- [53] Holash, J.; Maisonpierre, P. C.; Compton, D.; Boland, P.; Alexander, C. R.; Zagzag, D.; Yancopoulos, G. D. und Wiegand, S. J. (1999): Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF, *Science* 284 [5422], pp. 1994-1998. URL: ISI:000080932700049
- [54] Reiss, Y.; Machein, M. R. und Plate, K. (2005): The role of angiopoietins during angiogenesis in gliomas., *Brain Pathol* 15 [4], pp. 311-317.
- [55] Rafii, Shahin (2000): Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise., *J Clin Invest* 105 [1], pp. 17-19.
- [56] Lyden, David; Hattori, Koichi; Dias, Sergio; Costa, Carla; Blaikie, Pamela; Butros, Linda; Chadburn, Amy; Heissig, Beate; Marks, Willy; Witte, Larry; Wu, Yan; Hicklin, Daniel; Zhu, Zhenping; Hackett, Neil R.; Crystal, Ronald G.; Moore, Malcolm A. S.; Hajjar, Katherine A.; Manova, Katia; Benezra, Robert und Rafii, Shahin (2001): Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth, *Nat Med* 7 [11], pp. 1194-1201. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/nm1101-1194>
- [57] Wang, Jun; Wu, Kaichun; Zhang, Dexin; Tang, Hongwei; Xie, Huahong; Hong, Liu; Pan, Yanglin; Lan, Mei; Hu, Shengjuan; Ning, Xiaoxuan und Fan, Daiming (2005): Expressions and clinical significances of angiopoietin-1, -2 and Tie2 in human gastric cancer, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 337 [1], pp. 386-393. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WBK-4H4T1YM-6/2/be9d2cfc352df675f3d097dc71aea89>
- [58] Etoh, Tsuyoshi; Inoue, Hiroshi; Tanaka, Shinji; Barnard, Graham F.; Kitano, Seigo und Mori, Masaki (2001): Angiopoietin-2 Is Related to Tumor Angiogenesis in Gastric Carcinoma: Possible in Vivo Regulation via Induction of Proteases, *Cancer Research* 61 [5], pp. 2145-2153. URL: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/abstract/61/5/2145>
- [59] Ahmad, Syed A.; Liu, Wenbiao; Jung, Young D.; Fan, Fan; Wilson, Michael; Reinmuth, Niels; Shaheen, Raymond M.; Bucana, Corazon D. und Ellis, Lee M. (2001): The Effects of Angiopoietin-1 and -2 on Tumor Growth and Angiogenesis in Human Colon Cancer, *Cancer Research* 61 [4], pp. 1255-1259. URL: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/abstract/61/4/1255>

- [60] Tanaka, S; Mori, M; Sakamoto, Y; Makuuchi, M; Sugimachi, K und Wands, JR (1999): Biologic significance of angiopoietin-2 expression in human hepatocellular carcinoma, *The Journal of Clinical Investigation* 103 [3], pp. 341-345.
- [61] Takanami, I (2004): Overexpression of Ang-2 mRNA in non-small cell lung cancer: association with angiogenesis and poor prognosis., *Oncol Rep* 12 [4], pp. 849-853.
- [62] Stoeltzing, Oliver; Ahmad, Syed A.; Liu, Wenbiao; McCarty, Marya F.; Wey, Jane S.; Parikh, Alexander A.; Fan, Fan; Reinmuth, Niels; Kawaguchi, Michiya; Bucana, Corazon D. und Ellis, Lee M. (2003): Angiopoietin-1 Inhibits Vascular Permeability, Angiogenesis, and Growth of Hepatic Colon Cancer Tumors, *Cancer Research* 63 [12], pp. 3370-3377. URL: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/abstract/63/12/3370>
- [63] Tian, S.; Hayes, A. J.; Metheny-Barlow, L. J. und Li, L. Y. (2002): Stabilization of breast cancer xenograft tumour neovasculature by angiopoietin-1., *Br J Cancer* 86 [4], pp. 645-651.
- [64] Machein, Marcia Regina; Knedla, Anette; Knoth, Rolf; Wagner, Shawn; Neuschl, Elvira und Plate, Karl H. (2004): Angiopoietin-1 Promotes Tumor Angiogenesis in a Rat Glioma Model, *American Journal of Pathology* 165 [5], pp. 1557-1570. URL: <http://ajp.amjpathol.org/cgi/content/abstract/165/5/1557>
- [65] Shim, Winston S. N.; Teh, Ming; Bapna, Akanksha; Kim, Injune; Koh, Gou Young; Mack, Peter O. P. und Ge, Ruowen (2002): Angiopoietin 1 Promotes Tumor Angiogenesis and Tumor Vessel Plasticity of Human Cervical Cancer in Mice, *Experimental Cell Research* 279 [2], pp. 299-309. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WFC-46SXWMW-F/2/0a76de979a3b6195f8db70cce96315ff>
- [66] Zagzag, David; Hooper, Andrea; Friedlander, David R.; Chan, Wai; Holash, Jocelyn; Wiegand, Stanley J.; Yancopoulos, George D. und Grumet, Martin (1999): In Situ Expression of Angiopoietins in Astrocytomas Identifies Angiopoietin-2 as an Early Marker of Tumor Angiogenesis, *Experimental Neurology* 159 [2], pp. 391-400. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WFG-45GMCVV-17/2/1e387454c6e2f9a9bfaeab985c6cb293>
- [67] Oliner, Jonathan; Min, Hosung; Leal, Juan; Yu, Dongyin; Rao, Shashirekha; You, Edward; Tang, Xiu; Kim, Haejin; Meyer, Susanne; Han, Seog Joon; Hawkins, Nessa; Rosenfeld, Robert; Davy, Elyse; Graham, Kevin; Jacobsen, Frederick; Stevenson, Shirley; Ho, Joanne; Chen, Qing; Hartmann, Thomas; Michaels, Mark; Kelley, Michael; Li, Luke; Sitney, Karen; Martin, Frank; Sun, Ji Rong; Zhang, Nancy; Lu, John; Estrada, Juan; Kumar, Rakesh; Coxon, Angela; Kaufman, Stephen; Pretorius, James; Scully, Sheila; Cattley, Russ; Payton, Marc; Coats, Steve; Nguyen, Linh; Desilva, Binodh; Ndifor, Anthony; Hayward, Isaac; Radinsky, Robert; Boone, Tom und Kendall, Richard (2004): Suppression of angiogenesis and tumor growth by selective inhibition of angiopoietin-2, *Cancer Cell* 6 [5], pp. 507-516. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WWK-4DT4JCJ-D/2/63759263199a794945e08742f0866953>
- [68] Oka, N.; Yamamoto, Y; Nishitani, M.; Kanayama, H. O. und Kagawa, S. (2005): Expression of angiopoietin-1 and -2, and its clinical significance in human bladder cancer., *BJU Int* 95 [4], pp. 660-663.
- [69] Lind, A.J.; Wikstrom, P.; Granfors, T.; Egevad, L.; Stattin, P. und Bergh, A. (2005): Angiopoietin 2 expression is related to histological grade, vascular density, metastases, and outcome in prostate cancer., *Prostate* 62 [4], pp. 394-399.
- [70] Goodrich, James A.; Cutler, Gene und Tjian, Robert (1996): Contacts in Context: Promoter Specificity and Macromolecular Interactions in Transcription, *Cell* 84 [6], pp. 825-830. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WSN-41BD76P-4/2/61fc02e44a9a24d0064e5f88d47b1859>
- [71] McKnight, S. L. (1996): Transcription revisited: a commentary on the 1995 Cold Spring Harbor Laboratory meeting, "Mechanisms of Eukaryotic Transcription", *Genes & Development* 10 [4], pp. 367-381. URL: <http://genesdev.cshlp.org/content/10/4/367.abstract>
- [72] Suzuki, Yutaka; Tsunoda, Tatsuhiko; Sese, Jun; Taira, Hiroto; Mizushima-Sugano, Junko; Hata, Hiroko; Ota, Toshio; Isogai, Takao; Tanaka, Toshihiro; Nakamura, Yusuke; Suyama, Akira; Sakaki, Yoshiyuki; Morishita, Shinichi; Okubo, Kousaku und Sugano, Sumio (2001): Identification and Characterization of the Potential Promoter Regions of 1031 Kinds of Human Genes, *Genome Research* 11 [5], pp. 677-684. URL: <http://genome.cshlp.org/content/11/5/677.abstract>
- [73] Albright, Shane R. und Tjian, Robert (2000): TAFs revisited: more data reveal new twists and confirm old ideas, *Gene* 242 [1-2], pp. 1-13. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T39-3YGDG07-1/2/89ab112632b5998330f5ec0c2ed554c2>
- [74] Orphanides, G.; Lagrange, T. und Reinberg, D. (1996): The general transcription factors of RNA polymerase II, *Genes & Development* 10 [21], pp. 2657-2683. URL: <http://genesdev.cshlp.org/content/10/21/2657.short>
- [75] Latchman, David S. (1997): Transcription factors: An overview, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 29 [12], pp. 1305-1312. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TCH-3SR33FR-2/2/2ea35baca9053dee9825a611ad9e8991>
- [76] Scheidereit, Claus (1996): Transcription factors: important tool and targets for molecular medicine, *Journal of Molecular Medicine* 74, pp. 707-709.
- [77] Bird, A. (2002): DNA methylation patterns and epigenetic memory, *Genes & Development* 16 [1], pp. 6-21. URL: ISI:000173188100002
- [78] Russo, V. E. A.; Martienessen, R. A. und Riggs, A. D. (1996): Epigenetic mechanisms of gene regulation 1, 1. edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, ISBN: 0-87969-490-4.
- [79] Bestor, Timothy H. (2000): The DNA methyltransferases of mammals, *Human Molecular Genetics* 9 [16], pp. 2395-2402. URL: <http://hmg.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/9/16/2395>

- [80] Ehrlich, Melanie; Gama-Sosa, Miguel A.; Huang, Lan Hsiang; Midgett, Rose Marie; Kuo, Kenneth C.; McCune, Roy A. und Gehrke, Charles (1982): Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues or cells, *Nucleic Acids Research* 10 [8], pp. 2709-2721. URL: <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/10/8/2709>
- [81] Saxonov, S.; Berg, P. und Brutlag, D. L. (2006): A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters 1, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103 [5], pp. 1412-1417. URL: PM:16432200
- [82] Gardiner-Garden, M. und Frommer, M. (1987): CpG Islands in vertebrate genomes, *Journal of Molecular Biology* 196 [2], pp. 261-282. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WK7-4DMP8FD-G/2/052c7dcb1488bc57d752ead581fe6518>
- [83] Takai, D. und Jones, P. A. (2002): Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22 125, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99 [6], pp. 3740-3745. URL: PM:11891299
- [84] Siegfried, Zahava und Cedar, Howard (1997): DNA methylation: A molecular lock, *Current Biology* 7 [5], pp. R305-R307. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6VRT-4C4DHHH-62/2/e14037c06183e61cf575dae2441db241>
- [85] Tate, Peri H. und Bird, Adrian P. (1993): Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression, *Current Opinion in Genetics & Development* 3 [2], pp. 226-231. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6VSO-4C3V6FC-5/2/35f391cd874d38596b02087f1e8f5957>
- [86] Bird, Adrian P. und Wolffe, Alan P. (1999): Methylation-Induced Repression-- Belts, Braces, and Chromatin, *Cell* 99 [5], pp. 451-454. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WSN-41XW67W-3/2/8f92450361a393d99b6045ef71f2b8e6>
- [87] Hendrich, Brian und Bird, Adrian (1998): Identification and Characterization of a Family of Mammalian Methyl-CpG Binding Proteins, *Molecular and Cellular Biology* 18 [11], pp. 6538-6547. URL: <http://mcb.asm.org/cgi/content/abstract/18/11/6538>
- [88] Nan, Xincheng; Meehan, Richard R. und Bird, Adrian (1993): Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2, *Nucleic Acids Research* 21 [21], pp. 4886-4892. URL: <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/21/21/4886>
- [89] Jones, P. L.; Veenstra, G. J.; Wade, P. A.; Vermaak, D.; Kass, S. U.; Landsberger, N.; Strouboulis, J. und Wolffe, A. P. (1998): Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription 1, *Nat.Genet.* 19 [2], pp. 187-191. URL: PM:9620779
- [90] Ng, H. H.; Jeppesen, P. und Bird, A. (2000): Active repression of methylated genes by the chromosomal protein MBD1 2, *Mol.Cell Biol.* 20 [4], pp. 1394-1406. URL: PM:10648624
- [91] Jaenisch, R. und Bird, A. (2003): Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals 1, *Nat.Genet.* 33 Suppl, pp. 245-254. URL: PM:12610534
- [92] Jenuwein, Thomas und Allis, C. David (2001): Translating the Histone Code, *Science* 293 [5532], pp. 1074-1080. URL: <http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/293/5532/1074>
- [93] Verdone, Loredana; Agricola, Eleonora; Caserta, Micaela und Di Mauro, Ernesto (2006): Histone acetylation in gene regulation, *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* 5 [3], pp. 209-221. URL: <http://bfgp.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/5/3/209>
- [94] ALLFREY, V. G.; FAULKNER, R. und MIRSKY, A. E. (1964): Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 51, pp. 786-794.
- [95] Spotswood, H. T. und Turner, B. M. (2002): An increasingly complex code., *J Clin Invest* 110 [5], pp. 577-582.
- [96] Zhang, Y. und Reinberg, D. (2001): Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails., *Genes Dev* 15 [18], pp. 2343-2360.
- [97] Forsberg, E. C. und Bresnick, E. H. (2001): Histone acetylation beyond promoters: long-range acetylation patterns in the chromatin world 1, *Bioessays* 23 [9], pp. 820-830. URL: PM:11536294
- [98] Wade, P. A. (2001): Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin 1, *Human Molecular Genetics* 10 [7], pp. 693-698. URL: PM:11257101
- [99] Cameron, Elizabeth E.; Bachman, Kurtis E.; Myohanen, Sanna; Herman, James G. und Baylin, Stephen B. (1999): Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer, *Nat Genet* 21 [1], pp. 103-107. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/5047>
- [100] Suzuki, Hiromu; Gabrielson, Edward; Chen, Wei; Anbazhagan, Ramaswamy; van Engeland, Manon; Weijenberg, Matty P.; Herman, James G. und Baylin, Stephen B. (2002): A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer, *Nat Genet* 31 [2], pp. 141-149. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/ng892>
- [101] Frohman, M. A.; Dush, M. K. und Martin, G. R. (1988): Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 [23], pp. 8998-9002.
- [102] Livak, Kenneth J. und Schmittgen, Thomas D. (2001): Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method, *Methods* 25 [4], pp. 402-408. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WN5-457MF4S-3/2/46ddfa7ac4e6bd9a57d68a58f1b633a3>
- [103] Nordeen, S. K. (1988): Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers., *Biotechniques* 6 [5], pp. 454-458.



- [104] Courey, A. J. und Tijan, R. (1988): Analysis of Sp1 in vivo reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamine-rich activation motif., *Cell* 55 [5], pp. 887-898.
- [105] Hagen, Gustav; Dennig, J rg; Prei<sup>−</sup>, Alexandra; Beato, Miguel und Suske, Guntram (1995): Functional Analyses of the Transcription Factor Sp4 Reveal Properties Distinct from Sp1 and Sp3, *Journal of Biological Chemistry* 270 [42], pp. 24989-24994. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/270/42/24989>
- [106] Hagen, Gustav; Muller, S.; Beato, Miguel und Suske, Guntram (1994): Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3., *EMBO J.* 13 [16], pp. 3843-3851.
- [107] Westwick, J. K.; Cox, A. D.; Der, C. J.; Cobb, M. H.; Hibi, M.; Karin, M. und Brenner, D. A. (1994): Oncogenic Ras activates c-Jun via a separate pathway from the activation of extracellular signal-regulated kinases, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 [13], pp. 6030-6034. URL: <http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/91/13/6030.abstract>
- [108] Majello, Barbara; De Luca, Pasquale; Hagen, Gustav; Suske, Guntram und Lania, Luigi (1994): Different members of the Sp1 multigene family exert opposite transcriptional regulation of the long terminal repeat of HIV-1, *Nucleic Acids Research* 22 [23], pp. 4914-4921. URL: <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/22/23/4914>
- [109] Juttermann, R.; Li, E. und Jaenisch, R. (1994): Toxicity of 5-aza-2'-Deoxycytidine to Mammalian Cells is Mediated Primarily by Covalent Trapping of DNA Methyltransferase Rather than DNA demethylation, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91 [25], pp. 11797-11801. URL: <http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/91/25/11797>
- [110] Augustin, H. G. und Reiss, Y. (2003): EphB receptors and ephrinB ligands: regulators of vascular assembly and homeostasis, *Cell Tissue Res.* 314 [1], pp. 25-31. URL: PM:12905065
- [111] Muskavitch, M. A. (1994): Delta-notch signaling and Drosophila cell fate choice, *Dev.Biol.* 166 [2], pp. 415-430. URL: PM:7813766
- [112] Irvine, K. D. (1999): Fringe, Notch, and making developmental boundaries, *Curr.Opin.Genet.Dev.* 9 [4], pp. 434-441. URL: PM:10449349
- [113] Artavanis-Tsakonas, S.; Rand, M. D. und Lake, R. J. (1999): Notch signaling: cell fate control and signal integration in development, *Science* 284 [5415], pp. 770-776. URL: PM:10221902
- [114] Troyanovsky, Boris; Levchenko, Tetyana; Mansson, Goran; Matvijenko, Olga und Holmgren, Lars (2001): Angiostatin: An Angiostatin Binding Protein That Regulates Endothelial Cell Migration and Tube Formation, *The Journal of Cell Biology* 152 [6], pp. 1247-1254. URL: <http://jcb.rupress.org/cgi/content/abstract/152/6/1247>
- [115] Osada, Makoto; Yatomi, Yutaka; Ohmori, Tsukasa; Ikeda, Hitoshi und Ozaki, Yukio (2002): Enhancement of sphingosine 1-phosphate-induced migration of vascular endothelial cells and smooth muscle cells by an EDG-5 antagonist, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 299 [3], pp. 483-487. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WBK-477GCJ0-8/2/39f5530893eab599f28935a6958bb61f>
- [116] Suske, G. (2000): Transient Transfection of Schneider Cells in the Study of Transcription Factors, *Methods Mol Biol* 130, pp. 175-187.
- [117] Hasegawa, Y.; Abe, M.; Yamazaki, T.; Niizeki, O.; Shiiba, K.; Sasaki, I. und Sato, Y. (2004): Transcriptional regulation of human angiopoietin-2 by transcription factor Ets-1, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 316 [1], pp. 52-58. URL: ISI:000220105800009
- [118] Hegen, A.; Koidl, S.; Weindel, K.; Marme, D.; Augustin, H. G. und Fiedler, U. (2004): Expression of angiopoietin-2 in endothelial cells is controlled by positive and negative regulatory promoter elements, *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 24 [10], pp. 1803-1809. URL: ISI:000224326200012
- [119] Herman, J. G. und Baylin, S. B. (2003): Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation, *N.Engl.J.Med.* 349 [21], pp. 2042-2054. URL: PM:14627790
- [120] Feinberg, A. P. und Vogelstein, B. (1983): Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts, *Nature* 301 [5895], pp. 89-92. URL: PM:6185846
- [121] Liotta, Lance A. und Kohn, Elise C. (2001): The microenvironment of the tumour-host interface, *Nature* 411 [6835], pp. 375-379. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/35077241>
- [122] Fidler, Isaiah J. (2003): The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited, *Nature Reviews Cancer* 3 [6], pp. 453-458. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc1098>
- [123] Creusot, F.; Acs, G. und Christman, J. K. (1982): Inhibition of DNA methyltransferase and induction of Friend erythroleukemia cell differentiation by 5-azacytidine and 5-aza-2'- deoxycytidine, *Journal of Biological Chemistry* 257 [4], pp. 2041-2048. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/257/4/2041>
- [124] Hellebrekers, Debby M. E. I.; Jair, Kam Wing; Vire, Emmanuelle; Eguchi, Sayaka; Hoebers, Nicole T. H.; Fraga, Mario F.; Esteller, Manel; Fuks, Francois; Baylin, Stephen B.; van Engeland, Manon und Griffioen, Arjan W. (2006): Angiostatic activity of DNA methyltransferase inhibitors, *Molecular Cancer Therapeutics* 5 [2], pp. 467-475. URL: <http://mct.aacrjournals.org/cgi/content/abstract/5/2/467>
- [125] Hellebrekers, Debby M. E. I.; Melotte, Veerle; Vire, Emmanuelle; Langenkamp, Elise; Molema, Grietje; Fuks, Francois; Herman, James G.; Van Criekinge, Wim; Griffioen, Arjan W. und van Engeland, Manon (2007): Identification of Epigenetically Silenced Genes in Tumor Endothelial Cells, *Cancer Research* 67 [9], pp. 4138-4148. URL: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/abstract/67/9/4138>
- [126] Momparler, R. L.; Bouffard, D. Y.; Momparler, L. F.; Dionne, J.; Belanger, K. und Ayoub, J. (1997): Pilot phase I-II study on 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine) in patients with metastatic lung cancer, *Anticancer Drugs* 8 [4], pp. 358-368. URL: PM:9180389
- [127] Flanagan, J. G. und Vanderhaeghen, P. (1998): The ephrins and Eph receptors in neural development, *Annu.Rev.Neurosci.* 21, pp. 309-345. URL: PM:9530499

- [128] Wang, H. U.; Chen, Z. F. und Anderson, D. J. (1998): Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4, *Cell* 93 [5], pp. 741-753. URL: PM:9630219
- [129] Gale, N. W.; Baluk, P.; Pan, L.; Kwan, M.; Holash, J.; DeChiara, T. M.; McDonald, D. M. und Yancopoulos, G. D. (2001): Ephrin-B2 selectively marks arterial vessels and neovascularization sites in the adult, with expression in both endothelial and smooth-muscle cells, *Dev.Biol.* 230 [2], pp. 151-160. URL: PM:11161569
- [130] Hamada, K.; Oike, Y.; Ito, Y.; Maekawa, H.; Miyata, K.; Shimomura, T. und Suda, T. (2003): Distinct roles of ephrin-B2 forward and EphB4 reverse signaling in endothelial cells, *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 23 [2], pp. 190-197. URL: PM:12588758
- [131] Fuller, T.; Korff, T.; Kilian, A.; Dandekar, G. und Augustin, H. G. (2003): Forward EphB4 signaling in endothelial cells controls cellular repulsion and segregation from ephrinB2 positive cells, *J.Cell Sci.* 116 [Pt 12], pp. 2461-2470. URL: PM:12734395
- [132] Masood, Rizwan; Xia, Guangbin; Smith, D. Lynne; Scalia, Piergips; Still, Jonathan G.; Tulpule, Anil und Gill, Parkash S. (2005): Ephrin B2 expression in Kaposi sarcoma is induced by human herpesvirus type 8: phenotype switch from venous to arterial endothelium, *Blood* 105 [3], pp. 1310-1318. URL: <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/cgi/content/abstract/bloodjournal;105/3/1310>
- [133] Hainaud, P.; Contreres, J. O.; Villemain, A.; Liu, L. X.; Plouet, J.; Tobelem, G. und Dupuy, E. (2006): The role of the vascular endothelial growth factor-Delta-like 4 ligand/Notch4-ephrin B2 cascade in tumor vessel remodeling and endothelial cell functions, *Cancer Res.* 66 [17], pp. 8501-8510. URL: PM:16951162
- [134] Harrington, L. S.; Sainson, R. C.; Williams, C. K.; Taylor, J. M.; Shi, W.; Li, J. L. und Harris, A. L. (2008): Regulation of multiple angiogenic pathways by Dll4 and Notch in human umbilical vein endothelial cells, *Microvasc.Res.* 75 [2], pp. 144-154. URL: PM:17692341
- [135] Yan, M. und Plowman, G. D. (2007): Delta-like 4/Notch signaling and its therapeutic implications 2, *Clin.Cancer Res.* 13 [24], pp. 7243-7246. URL: PM:18094402
- [136] Dufraigne, J.; Funahashi, Y. und Kitajewski, J. (2008): Notch signaling regulates tumor angiogenesis by diverse mechanisms, *Oncogene* 27 [38], pp. 5132-5137. URL: PM:18758482
- [137] Fuks, Francois; Burgers, Wendy A.; Brehm, Alexander; Hughes-Davies, Luke und Kouzarides, Tony (2000): DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity, *Nat Genet* 24 [1], pp. 88-91. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/17150>
- [138] Nguyen, Carvell T.; Weisenberger, Daniel J.; Velicescu, Mihaela; Gonzales, Felicidad A.; Lin, Joy C. Y.; Liang, Gangning und Jones, Peter A. (2002): Histone H3-Lysine 9 Methylation Is Associated with Aberrant Gene Silencing in Cancer Cells and Is Rapidly Reversed by 5-Aza-2'-deoxycytidine, *Cancer Research* 62 [22], pp. 6456-6461. URL: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/abstract/62/22/6456>
- [139] Lehnertz, B.; Ueda, Y.; Derijck, A. A.; Braunschweig, U.; Perez-Burgos, L.; Kubicek, S.; Chen, T.; Li, E.; Jenuwein, T. und Peters, A. H. (2003): Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin, *Curr.Biol.* 13 [14], pp. 1192-1200. URL: PM:12867029
- [140] Mezquita, J.; Mezquita, P.; Montserrat, P.; Mezquita, B.; Franccone, V.; Vilagrasa, X. und Mezquita, C. (2000): Genomic structure and alternative splicing of chicken angiopoietin-2, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 275 [2], pp. 643-651. URL: ISI:000089069700065
- [141] Simon, M. P.; Tournaire, R. und Pouyssegur, J. (2008): The angiopoietin-2 gene of endothelial cells is up-regulated in hypoxia by a HIF binding site located in its first intron and by the central factors GATA-2 and Ets-1, *Journal of Cellular Physiology* 217 [3], pp. 809-818.
- [142] Butler, Jennifer E. F. und Kadonaga, James T. (2002): The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression, *Genes & Development* 16 [20], pp. 2583-2592. URL: <http://genesdev.cshlp.org/content/16/20/2583.short>
- [143] Weis, L. und Reinberg, D. (1992): Transcription by RNA polymerase II: initiator-directed formation of transcription-competent complexes, *The FASEB Journal* 6 [14], pp. 3300-3309. URL: <http://www.fasebj.org/cgi/content/abstract/6/14/3300>
- [144] Wong, Jie Min und Bateman, Erik (1994): TBP-DNA interactions in the minor groove discriminate between A:T and T:A base pairs, *Nucleic Acids Research* 22 [10], pp. 1890-1896. URL: <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/22/10/1890>
- [145] Hahn, S.; Buratowski, S.; Sharp, P. A. und Guarente, L. (1989): Yeast TATA-binding protein TFIID binds to TATA elements with both consensus and nonconsensus DNA sequences, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 [15], pp. 5718-5722. URL: <http://www.pnas.org/content/86/15/5718.abstract>
- [146] Zenzie-Gregory, B.; Khachi, A.; Garraway, I. P. und Smale, S. T. (1993): Mechanism of initiator-mediated transcription: evidence for a functional interaction between the TATA-binding protein and DNA in the absence of a specific recognition sequence, *Molecular and Cellular Biology* 13 [7], pp. 3841-3849. URL: <http://mcb.asm.org/cgi/content/abstract/13/7/3841>
- [147] Singer, V. L.; Wobbe, C. R. und Struhl, K. (1990): A wide variety of DNA sequences can functionally replace a yeast TATA element for transcriptional activation, *Genes & Development* 4 [4], pp. 636-645. URL: <http://genesdev.cshlp.org/content/4/4/636.abstract>
- [148] Kim, Youngchang; Geiger, James; Hahn, Steven und Sigler, Paul B. (1993): Crystal structure of a yeast TBP/TATA-box complex, *Nature* 365 [6446], pp. 512-520. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/365512a0>
- [149] Smale, Stephen T. und Kadonaga, James T. (2003): THE RNA POLYMERASE II CORE PROMOTER, *Annual Review of Biochemistry* 72 [1], pp. 449-479. URL: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161520>

- [150] Smale, S. T. und Baltimore, D. (1989): The "initiator" as a transcription control element., *Cell* 57 [1], pp. 103-113.
- [151] Smale, S. T.; Schmidt, M. C.; Berk, A. J. und Baltimore, D. (1990): Transcriptional activation by Sp1 as directed through TATA or initiator: specific requirement for mammalian transcription factor IID, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 [12], pp. 4509-4513. URL: <http://www.pnas.org/content/87/12/4509.abstract>
- [152] Burke, T. W. und Kadonaga, J. T. (1996): Drosophila TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters, *Genes & Development* 10 [6], pp. 711-724. URL: <http://genesdev.cshlp.org/content/10/6/711.abstract>
- [153] Kaufmann, J. und Smale, S. T. (1994): Direct recognition of initiator elements by a component of the transcription factor IID complex, *Genes & Development* 8 [7], pp. 821-829. URL: <http://genesdev.cshlp.org/content/8/7/821.abstract>
- [154] Chalkley, G. E. und Verrijzer, C. P. (1999): DNA binding site selection by RNA polymerase II TAFs: a TAF(II)250-TAF(II)150 complex recognizes the initiator., *EMBO J.* 18 [17], pp. 4835-4845.
- [155] Javahery, R.; Khachi, A.; Lo, K.; Zenzie-Gregory, B. und Smale, S. T. (1994): DNA sequence requirements for transcriptional initiator activity in mammalian cells, *Molecular and Cellular Biology* 14 [1], pp. 116-127. URL: <http://mcb.asm.org/cgi/content/abstract/14/1/116>
- [156] Bucher, Philipp (1990): Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences, *Journal of Molecular Biology* 212 [4], pp. 563-578. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WK7-4DM1GXH-2K/2/5a5fce54e3741d5aa08e855f63a1cf66>
- [157] Lo, K. und Smale, S. T. (1996): Generality of a functional initiator consensus sequence., *Gene* 182 [1-2], pp. 13-22.
- [158] Kingsley, C. und Winoto, A. (1992): Cloning of GT box-binding proteins: a novel Sp1 multigene family regulating T-cell receptor gene expression, *Molecular and Cellular Biology* 12 [10], pp. 4251-4261. URL: <http://mcb.asm.org/cgi/content/abstract/12/10/4251>
- [159] Sapetschnig, Alexandra; Koch, Franziska; Rischitor, Grigore; Mennenga, Trientje und Suske, Guntram (2004): Complexity of Translationally Controlled Transcription Factor Sp3 Isoform Expression, *Journal of Biological Chemistry* 279 [40], pp. 42095-42105. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/279/40/42095>
- [160] Kennett, S. B.; Udvardi, A. J. und Horowitz, J. M. (1997): Sp3 encodes multiple proteins that differ in their capacity to stimulate or repress transcription, *Nucleic Acids Research* 25 [15], pp. 3110-3117. URL: <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/25/15/3110>
- [161] Santoro, Claudio; Mermoud, Nicolas; Andrews, Philip C. und Tjian, Robert (1988): A family of human CCAAT-box-binding proteins active in transcription and DNA replication: cloning and expression of multiple cDNAs, *Nature* 334 [6179], pp. 218-224. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/334218a0>
- [162] Suske, G. (1999): The Sp-family of transcription factors, *Gene* 238 [2], pp. 291-300. URL: ISI:000083076000002
- [163] Orzechowski, Hans Dieter; Gunther, Astrid; Menzel, Stefan; Zimmermann, Andreas; Funke-Kaiser, Heiko; Real, Robert; Subkowski, Thomas; Zollmann, Frank S. und Paul, Martin (2001): Transcriptional Mechanism of Protein Kinase C-Induced Isoform-Specific Expression of the Gene for Endothelin-Converting Enzyme-1 in Human Endothelial Cells, *Molecular Pharmacology* 60 [6], pp. 1332-1342. URL: <http://molpharm.aspetjournals.org/cgi/content/abstract/60/6/1332>
- [164] Koizumi, S.; Fisher, R. J.; Fujiwara, S.; Jorcyk, C.; Bhat, N. K.; Seth, A. und Papas, T. S. (1990): Isoforms of the human ets-1 protein: generation by alternative splicing and differential phosphorylation., *Oncogene* 5 [5], pp. 675-681.
- [165] Ye, Feng Chun; Blackbourn, David J.; Mengel, Michael; Xie, Jian Ping; Qian, Li Wu; Greene, Whitney; Yeh, I. Tien; Graham, David und Gao, Shou Jiang (2007): Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Promotes Angiogenesis by Inducing Angiopoietin-2 Expression via AP-1 and Ets1, *The Journal of Virology* 81 [8], pp. 3980-3991. URL: <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/81/8/3980>
- [166] Kadonaga, James T.; Carner, Kristin R.; Masiarz, Frank R. und Tjian, Robert (1987): Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain, *Cell* 51 [6], pp. 1079-1090. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WSN-4C590NY-4T/2/f6b27a6bef0e90027e7d370dd4cd5fab>
- [167] Philipsen, S. und Suske, G. (1999): A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors, *Nucleic Acids Research* 27 [15], pp. 2991-3000. URL: <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/27/15/2991>
- [168] Turner, Jeremy und Crossley, Merlin (1999): Mammalian Kr<sup>ppel</sup>-like transcription factors: more than just a pretty finger, *Trends in Biochemical Sciences* 24 [6], pp. 236-240. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TCV-3WS61RM-C/2/24eb29e7049a7fa99b52fcc7eeafd125>
- [169] Black, A. R.; Black, J. D. und Azizkhan-Clifford, J. (2001): Sp1 and krüppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer., *Journal of Cellular Physiology* 188, pp. 143-160.
- [170] Wierstra, Inken (2008): Sp1: Emerging roles--Beyond constitutive activation of TATA-less housekeeping genes, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 372 [1], pp. 1-13. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WBK-4S4B7R7-3/2/6167f5d1a1c6b8b273e053afa7413ebe>
- [171] Hagen, Gustav; Muller, Susanne; Beato, Miguel und Suske, Guntram (1992): Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins: a family of Sp1 related genes, *Nucleic Acids Research* 20 [21], pp. 5519-5525. URL: <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/20/21/5519>



- [172] Gill, G.; Pascal, E.; Tseng, Z. H. und Tjian, R. (1994): A glutamine-rich hydrophobic patch in transcription factor Sp1 contacts the dTAFII110 component of the Drosophila TFIID complex and mediates transcriptional activation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 [1], pp. 192-196. URL: <http://www.pnas.org/content/91/1/192.abstract>
- [173] Pascal, E. und Tjian, R. (1991): Different activation domains of Sp1 govern formation of multimers and mediate transcriptional synergism, *Genes & Development* 5 [9], pp. 1646-1656. URL: <http://genesdev.cshlp.org/content/5/9/1646.abstract>
- [174] Su, W.; Jackson, S.; Tjian, R. und Echols, H. (1991): DNA looping between sites for transcriptional activation: self-association of DNA-bound Sp1, *Genes & Development* 5 [5], pp. 820-826. URL: <http://genesdev.cshlp.org/content/5/5/820.abstract>
- [175] Emili, A.; Greenblatt, J. und Ingles, C. J. (1994): Species-specific interaction of the glutamine-rich activation domains of Sp1 with the TATA box-binding protein, *Molecular and Cellular Biology* 14 [3], pp. 1582-1593. URL: <http://mcb.asm.org/cgi/content/abstract/14/3/1582>
- [176] Tanese, Naoko; Saluja, Daman; Vassallo, Milo Ç&F; Chen, Jin Long und Admon, Arie (1996): Molecular cloning and analysis of two subunits of the human TFIID complex: hTAFII130 and hTAFII100, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 [24], pp. 13611-13616. URL: <http://www.pnas.org/content/93/24/13611.abstract>
- [177] Hoey, Timothy; Weinzierl, Robert O. J.; Gill, Grace; Chen, Jin Long; Dynlacht, Brian David und Tjian, Robert (1993): Molecular cloning and functional analysis of Drosophila TAF110 reveal properties expected of coactivators, *Cell* 72 [2], pp. 247-260. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WSN-4D5MN00-B/2/6bc9651f829c3a2e4911cc2dbca43bc9>
- [178] Emami, K. H.; Burke, T. W. und Smale, S. T. (1998): Sp1 activation of a TATA-less promoter requires a species-specific interaction involving transcription factor IID, *Nucleic Acids Research* 26 [3], pp. 839-846. URL: <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/26/3/839>
- [179] Dorris, David R. und Struhl, Kevin (2000): Artificial Recruitment of TFIID, but Not RNA Polymerase II Holoenzyme, Activates Transcription in Mammalian Cells, *Molecular and Cellular Biology* 20 [12], pp. 4350-4358. URL: <http://mcb.asm.org/cgi/content/abstract/20/12/4350>
- [180] Udvadia, A. J.; Templeton, D. J. und Horowitz, J. M. (1995): Functional interactions between the retinoblastoma (Rb) protein and Sp-family members: superactivation by Rb requires amino acids necessary for growth suppression, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 [9], pp. 3953-3957. URL: <http://www.pnas.org/content/92/9/3953.abstract>
- [181] Ihn, H. und Trojanowska, M. (1997): Sp3 is a transcriptional activator of the human alpha2(I) collagen gene, *Nucleic Acids Research* 25 [18], pp. 3712-3717. URL: <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/25/18/3712>
- [182] Dennig, Jörg; Hagen, Gustav; Beato, Miguel und Suske, Guntram (1995): Members of the Sp Transcription Factor Family Control Transcription from the Uteroglobin Promoter, *Journal of Biological Chemistry* 270 [21], pp. 12737-12744. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/270/21/12737>
- [183] Sjøttem, E.; Anderssen, S. und Johansen, T. (1996): The promoter activity of long terminal repeats of the HERV-H family of human retrovirus-like elements is critically dependent on Sp1 family proteins interacting with a GC/GT box located immediately 3' to the TATA box, *The Journal of Virology* 70 [1], pp. 188-198. URL: <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/70/1/188>
- [184] Yu, Bo; Datta, Pran K. und Bagchi, Sriata (2003): Stability of the Sp3-DNA complex is promoter-specific: Sp3 efficiently competes with Sp1 for binding to promoters containing multiple Sp-sites, *Nucleic Acids Research* 31 [18], pp. 5368-5376. URL: <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/31/18/5368>
- [185] Birnbaum, M. J.; van Wijnen, A. J.; Odgren, P. R.; Last, T. J.; Suske, G.; Stein, G. S. und Stein, J. L. (1995): Sp1 trans-activation of cell cycle regulated promoters is selectively repressed by Sp3., *Biochemistry* 34 [50], pp. 16503-16508.
- [186] Majello, Barbara; De Luca, Pasquale; Suske, Guntram und Lania, Luigi (1995): Differential transcriptional regulation of c-myc promoter through the same DNA binding sites targeted by Sp1-like proteins., *Oncogene* 10 [9], pp. 1841-1848.
- [187] Ritchie, Shawn; Boyd, F. Mark; Wong, Jason und Bonham, Keith (2000): Transcription of the Human c-Src Promoter Is Dependent on Sp1, a Novel Pyrimidine Binding Factor SPy, and Can Be Inhibited by Triplex-forming Oligonucleotides, *Journal of Biological Chemistry* 275 [2], pp. 847-854. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/275/2/847>
- [188] Dennig, J.; Beato, Miguel und Suske, G. (1996): An inhibitor domain in Sp3 regulates its glutamine-rich activation domains., *EMBO J.* 15 [20], pp. 5659-5667.
- [189] Valin, A. und Gill, G. (2007): Regulation of the dual-function transcription factor Sp3 by SUMO., *Biochemical Society Transaction* 35 [Pt 6], pp. 1393-1396.
- [190] Sapetschnig, Alexandra; Rischitor, Grigore; Braun, H.; Doll, A.; Schergaut, M.; Melchior, F. und Suske, G. (2002): Transcription factor Sp3 is silenced through SUMO modification by PIAS1., *EMBO J.* 21 [19], pp. 5206-5215.
- [191] Ross, Sarah; Best, Jennifer L.; Zon, Leonard I. und Gill, Grace (2002): SUMO-1 Modification Represses Sp3 Transcriptional Activation and Modulates Its Subnuclear Localization, *Molecular Cell* 10 [4], pp. 831-842. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WSR-4C5PPRF-N/2/c1b4003c17f84f855aa32a3ebf9587c7>
- [192] Hata, Yasuaki; Duh, Elia; Zhang, Kang; Robinson, Gregory S. und Aiello, Lloyd Paul (1998): Transcription Factors Sp1 and Sp3 Alter Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Expression through a Novel Recognition Sequence, *Journal of Biological Chemistry* 273 [30], pp. 19294-19303. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/273/30/19294>

- [193] Ikeda, T.; Wakiya, K. und Shibuya, M. (1996): Characterization of the promoter region for flt-1 tyrosine kinase gene, a receptor for vascular endothelial growth factor, *Growth Factors* 13 [3-4], pp. 151-162. URL: PM:8919023
- [194] Schafer, G.; Cramer, T.; Suske, G.; Kemmner, W.; Wiedenmann, B. und Hocker, M. (2003): Oxidative stress regulates vascular endothelial growth factor-A gene transcription through Sp1-and Sp3-dependent activation of two proximal GC-rich promoter elements, *Journal of Biological Chemistry* 278 [10], pp. 8190-8198. URL: ISI:000181466800058
- [195] Kageyama, R.; Merlino, G. T. und Pastan, I. (1988): Epidermal growth factor (EGF) receptor gene transcription. Requirement for Sp1 and an EGF receptor-specific factor, *Journal of Biological Chemistry* 263 [13], pp. 6329-6336. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/263/13/6329>
- [196] Shin, T. H.; Paterson, A. J.; Grant, J. H., III; Meluch, A. A. und Kudlow, J. E. (1992): 5-Azacytidine treatment of HA-A melanoma cells induces Sp1 activity and concomitant transforming growth factor alpha expression, *Molecular and Cellular Biology* 12 [9], pp. 3998-4006. URL: <http://mcb.asm.org/cgi/content/abstract/12/9/3998>
- [197] Dong, Lian; Wang, Weili; Wang, Fan; Stoner, Matthew; Reed, John C.; Harigai, Masayoshi; Samudio, Ismael; Kladden, Michael P.; Vyhldal, Cary und Safe, Stephen (1999): Mechanisms of Transcriptional Activation of bcl-2 Gene Expression by 17beta -Estradiol in Breast Cancer Cells, *Journal of Biological Chemistry* 274 [45], pp. 32099-32107. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/274/45/32099>
- [198] Li, F. und Altieri, D. C. (1999): Transcriptional analysis of human survivin gene expression 1, *Biochem.J.* 344 Pt 2, pp. 305-311. URL: PM:10567210
- [199] Wang, Liwei; Wei, Daoyan; Huang, Suyun; Peng, Zhihai; Le, Xiangdong; Wu, Tsung Teh; Yao, James; Ajani, Jaffer und Xie, Keping (2003): Transcription Factor Sp1 Expression Is a Significant Predictor of Survival in Human Gastric Cancer, *Clinical Cancer Research* 9 [17], pp. 6371-6380. URL: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/content/abstract/9/17/6371>
- [200] Yao, James C.; Wang, Liwei; Wei, Daoyan; Gong, Weida; Hassan, Manal; Wu, Tsung Teh; Mansfield, Paul; Ajani, Jaffer und Xie, Keping (2004): Association between Expression of Transcription Factor Sp1 and Increased Vascular Endothelial Growth Factor Expression, Advanced Stage, and Poor Survival in Patients with Resected Gastric Cancer, *Clinical Cancer Research* 10 [12], pp. 4109-4117. URL: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/content/abstract/10/12/4109>
- [201] Hosoi, Y.; Watanabe, T.; Nakagawa, K.; Matsumoto, Y.; Enomoto, A.; Morita, A.; Nagawa, H. und Suzuki, N. (2004): Up-regulation of DNA-dependent protein kinase activity and Sp1 in colorectal cancer, *Int.J Oncol* 25 [2], pp. 461-468. URL: PM:15254745
- [202] Yuan, Hai Tao; Yang, Su Ping und Woolf, Adrian Spencer (2000): Hypoxia up-regulates angiopoietin-2, a Tie-2 ligand, in mouse mesangial cells, *Kidney Int.* 58 [5], pp. 1912-1919. URL: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1523-1755.2000.00363.x>
- [203] Etoh, Tsuyoshi; Kanai, Yae; Ushijima, Saori; Nakagawa, Tohru; Nakanishi, Yukihiro; Sasako, Mitsuru; Kitano, Seigo und Hirohashi, Setsuo (2004): Increased DNA Methyltransferase 1 (DNMT1) Protein Expression Correlates Significantly with Poorer Tumor Differentiation and Frequent DNA Hypermethylation of Multiple CpG Islands in Gastric Cancers, *American Journal of Pathology* 164 [2], pp. 689-699. URL: <http://ajp.amjpathol.org/cgi/content/abstract/164/2/689>
- [204] Watson, D. K.; McWilliams-Smith, M. J.; Nunn, M. F.; Duesberg, P. H.; O'Brien, S. J. und Papas, T. S. (1985): The ets sequence from the transforming gene of avian erythroblastosis virus, E26, has unique domains on human chromosomes 11 and 21: both loci are transcriptionally active., *Proc Natl Acad Sci U S A* 82 [21], pp. 7294-7298.
- [205] Wasyluk, B.; Hahn, S. L. und Giovane, A. (1993): The Ets family of transcription factors., *Eur J Biochem* 211 [1-2], pp. 7-18.
- [206] Nye, J. A.; Petersen, J. M.; Gunther, C. V.; Jonsen, M. D. und Graves, B. J. (1992): Interaction of murine ets-1 with GGA-binding sites establishes the ETS domain as a new DNA-binding motif, *Genes & Development* 6 [6], pp. 975-990. URL: <http://genesdev.cshlp.org/content/6/6/975.abstract>
- [207] Dittmer, Jürgen und Nordheim, Alfred (1998): Ets transcription factors and human disease, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1377 [2], pp. F1-F11. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T23-3TCFWNP-5/2/f933414768e6f28e5a1c63b092b6cc10>
- [208] Wernert, N.; Raes, M. B.; Lassalle, P.; Dehouck, M. P.; Gosselin, B.; Vandenbunder, B. und Stehelin, D. (1992): c-ets1 proto-oncogene is a transcription factor expressed in endothelial cells during tumor vascularization and other forms of angiogenesis in man., *American Journal of Pathology* 140 [1], pp. 119-127.
- [209] Wernert, Nicolas; Gilles, Frederic; Fafeur, Veronique; Bouali, Fatima; Raes, Marie Berthe; Pyke, Charles; Dupressoir, Thierry; Seitz, Gerhard; Vandenbunder, Bernard und Stehelin, Dominique (1994): Stromal Expression of c-Ets1 Transcription Factor Correlates with Tumor Invasion, *Cancer Research* 54 [21], pp. 5683-5688. URL: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/abstract/54/21/5683>
- [210] Maroulakou, I. G.; Papas, T. S. und Green, J. E. (1994): Differential expression of ets-1 and ets-2 proto-oncogenes during murine embryogenesis., *Oncogene* 9 [6], pp. 1551-1565.
- [211] Bolon, I.; Gouyer, V.; Devouassoux, M.; Vandenbunder, B.; Wernert, N.; Moro, D.; Brambilla, C. und Brambilla, E. (1995): Expression of c-ets-1, collagenase 1, and urokinase-type plasminogen activator genes in lung carcinomas., *American Journal of Pathology* 147 [5], pp. 1298-1310.
- [212] Tanaka, K.; Abe, M. und Sato, Y. (1999): Roles of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase in the signal transduction of basic fibroblast growth factor in endothelial cells during angiogenesis., *Jpn J Cancer Res* 90 [6], pp. 647-654.



- [213] Iwasaka, C.; Tanaka, K.; Abe, M. und Sato, Y. (1996): Ets-1 regulates angiogenesis by inducing the expression of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinase-1 and the migration of vascular endothelial cells., *J Cell Physiol.* 169 [3], pp. 522-531.
- [214] Wakiya, Kenji; Begue, Agnes; Stehelin, Dominique und Shibuya, Masabumi (1996): A cAMP Response Element and an Ets Motif Are Involved in the Transcriptional Regulation of flt-1 Tyrosine Kinase (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1) Gene, *Journal of Biological Chemistry* 271 [48], pp. 30823-30828. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/271/48/30823>
- [215] Iljin, K.; Dube, Antoinise; Kontusaari, S.; Korhonen, J.; Lahtinen, I.; Oettgen, Peter und Alitalo, K. (1999): Role of Ets factors in the activity and endothelial cell specificity of the mouse Tie gene promoter, *The FASEB Journal* 13 [2], pp. 377-386. URL: <http://www.fasebj.org/cgi/content/abstract/13/2/377>
- [216] Dube, Antoinise; Akbarali, Yasmin; Sato, Thomas N.; Libermann, Towia A. und Oettgen, Peter (1999): Role of the Ets Transcription Factors in the Regulation of the Vascular-Specific Tie2 Gene, *Circulation Research* 84 [10], pp. 1177-1185. URL: <http://circres.ahajournals.org/cgi/content/abstract/84/10/1177>
- [217] Oda, N.; Abe, M. und Sato, Y. (1999): ETS-1 converts endothelial cells to the angiogenic phenotype by inducing the expression of matrix metalloproteinases and integrin beta3., *J Cell Physiol.* 178 [2], pp. 121-132.
- [218] Logan, Susan K.; Garabedian, Michael J.; Campbell, Christine E. und Werb, Zena (1996): Synergistic Transcriptional Activation of the Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 Promoter via Functional Interaction of AP-1 and Ets-1 Transcription Factors, *Journal of Biological Chemistry* 271 [2], pp. 774-782. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/271/2/774>
- [219] Han, Baoguang; Liu, Naili; Yang, Xiaoming; Sun, Hui Bin und Yang, Yu Chung (2001): MRG1 Expression in Fibroblasts Is Regulated by Sp1/Sp3 and an Ets Transcription Factor, *Journal of Biological Chemistry* 276 [11], pp. 7937-7942. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/276/11/7937>
- [220] Block, K. L.; Shou, Y. und Poncz, M. (1996): An Ets/Sp1 interaction in the 5'-flanking region of the megakaryocyte- specific alpha IIb gene appears to stabilize Sp1 binding and is essential for expression of this TATA-less gene, *Blood* 88 [6], pp. 2071-2080. URL: <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/cgi/content/abstract/bloodjournal;88/6/2071>
- [221] Kavurma, Mary M.; Bobryshev, Yuri und Khachigian, Levon M. (2002): Ets-1 Positively Regulates Fas Ligand Transcription via Cooperative Interactions with Sp1, *Journal of Biological Chemistry* 277 [39], pp. 36244-36252. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/277/39/36244>
- [222] Dittmer, Jürgen (2003): The biology of the Ets1 proto-oncogene., *Mol Cancer* 2, pp. 29.
- [223] Davidson, B.; Risberg, B.; Goldberg, I.; Nesland, J. M.; Berner, A.; Tropé, C. G.; Kristensen, G. B.; Bryne, M. und Reich, R. (2001): Ets-1 mRNA expression in effusions of serous ovarian carcinoma patients is a marker of poor outcome., *Am J Surg Pathol* 25 [12], pp. 1493-1500.
- [224] Span, P. N.; Manders, P.; Heuvel, J. J.; Thomas, C. M.; Bosch, R. R.; Beex, L. V. und Sweep, C. G. (2002): Expression of the transcription factor Ets-1 is an independent prognostic marker for relapse-free survival in breast cancer., *Oncogene* 21 [55], pp. 8506-8509.
- [225] Folkman, Judah (1972): Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors., *Ann Surg* 175 [3], pp. 409-416.
- [226] Tjalma, W.; Van Marck, E.; Weyler, J.; Dirix, L.; Van Daele, A.; Goovaerts, G.; Albertyn, G. und van Dam, P. (1998): Quantification and prognostic relevance of angiogenic parameters in invasive cervical cancer., *Br J Cancer* 78 [2], pp. 170-174.
- [227] Chung, Y. C.; Hou, Y. C.; Chang, CN. und Hseu, T. H. (2006): Expression and prognostic significance of angiopoietin in colorectal carcinoma., *J Surg Oncol* 4, pp. 631-638.
- [228] Heimann, R.; Ferguson, D.; Gray, S. und Hellman, S. (1998): Assessment of intratumoral vascularization (angiogenesis) in breast cancer prognosis., *Br J Cancer* 78, pp. 170-174.
- [229] Angeletti, C. A.; Lucchi, M.; Fontanini, G.; Mussi, A.; Chella, A.; Ribechini, A.; Vignati, S. und Bevilacqua, G. (1996): Prognostic significance of tumoral angiogenesis in completely resected late stage lung carcinoma (Stage IIIA-N2): Impact of adjuvant therapies in a subset of patients at high risk of recurrence, *Cancer* 78 [3], pp. 409-415.
- [230] Liekens, S.; De Clercq, E. und Neyts, J. (2001): Angiogenesis: regulators and clinical applications, *Biochem.Pharmacol.* 61 [3], pp. 253-270. URL: PM:11172729
- [231] Kerbel, R. S. (1997): A cancer therapy resistant to resistance, *Nature* 390 [6658], pp. 335-336.
- [232] Carmeliet, Peter und Jain, Rakesh K. (2000): Angiogenesis in cancer and other diseases, *Nature* 407 [6801], pp. 249-257. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/35025220>
- [233] Lobov, I. B.; Brooks, P. C. und Lang, R. A. (2002): Angiopoietin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival in vivo, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 [17], pp. 11205-11210. URL: ISI:000177606900047
- [234] Koga, Kazunari; Todaka, Tatemi; Morioka, Motohiro; Hamada, Jun ichiro; Kai, Yutaka; Yano, Shigetoshi; Okamura, Akira; Takakura, Nobuyuki; Suda, Toshio und Ushio, Yukitaka (2001): Expression of Angiopoietin-2 in Human Glioma Cells and Its Role for Angiogenesis, *Cancer Research* 61 [16], pp. 6248-6254. URL: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/abstract/61/16/6248>
- [235] Nasarre, Patrick; Thomas, Markus; Kruse, Karoline; Helfrich, Iris; Wolter, Vivien; Deppermann, Carleen; Schadendorf, Dirk; Thurston, Gavin; Fiedler, Ulrike und Augustin, Hellmut G. (2009): Host-Derived Angiopoietin-2 Affects Early Stages of Tumor Development and Vessel Maturation but Is Dispensable for Later Stages of Tumor Growth, *Cancer Research* 69 [4], pp. 1324-1333. URL: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/abstract/69/4/1324>
- [236] Ellington, A. D. und Szostak, J. W. (1990): In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands., *Nature* 346 [6287], pp. 818-822.

- [237] White, Rebekah R.; Shan, S.; Ruscon, Christopher P.; Shetty, Geetha; Dewhirst, M. W.; Kontos, Christopher D. und Sullenger, Bruce A. (2003): Inhibition of rat corneal angiogenesis by a nuclease-resistant RNA aptamer specific for angiopoietin-2., *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 [9], pp. 5028-5033.
- [238] Hangai, Masanori; Moon, Yuen Sung; Kitaya, Norihiko; Chan, Candy K.; Wu, Da Yu; Peters, Kevin G.; Ryan, Stephen J. und Hinton, David R. (2001): Systemically Expressed Soluble Tie2 Inhibits Intraocular Neovascularization, *Human Gene Therapy* 12 [10], pp. 1311-1321. URL: <http://dx.doi.org/10.1089/104303401750270968>
- [239] Siemeister, Gerhard; Schirner, Michael; Weindel, Karin; Reusch, Petra; Menrad, Andreas; Marme, Dieter und Martiny-Baron, Georg (1999): Two Independent Mechanisms Essential for Tumor Angiogenesis: Inhibition of Human Melanoma Xenograft Growth by Interfering with either the Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Pathway or the Tie-2 Pathway, *Cancer Research* 59 [13], pp. 3185-3191. URL: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/abstract/59/13/3185>
- [240] Sarraf-Yazdi, Shiva; Mi, Jing; Moeller, Benjamin J.; Niu, Xilin; White, Rebekah R.; Kontos, Christopher D.; Sullenger, Bruce A.; Dewhirst, Mark W. und Clary, Bryan M. (2008): Inhibition of In Vivo Tumor Angiogenesis and Growth Via Systemic Delivery of an Angiopoietin 2-Specific RNA Aptamer, *Journal of Surgical Research* 146 [1], pp. 16-23. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WM6-4PYJCSJ-5/2/4423386e36961a36e8a4f64b27b16894>
- [241] Pandya, Nilesh M.; Dhalla, Naranjan S. und Santani, Dev D. (2001): Angiogenesis--a new target for future therapy, *Vascular Pharmacology* In Press, Corrected Proof. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6X3P-4JHMFKN-1/2/b3993693e610a2c37213edd3523d0177>
- [242] Hammes, H. P.; Lin, J. H.; Wagner, P.; Feng, Y.; vom Hagen, F.; Krzizok, T.; Renner, O.; Breier, G.; Brownlee, M. und Deutsch, U. (2004): Angiopoietin-2 causes pericyte dropout in the normal retina - Evidence for involvement in diabetic retinopathy, *Diabetes* 53 [4], pp. 1104-1110. URL: ISI:000220608800028
- [243] Papavassiliou, Athanasios G. (1998): Transcription-factor-modulating agents: precision and selectivity in drug design., *Mol Med Today* 4 [8], pp. 358-366.
- [244] Mansilla, Sylvia; Priebe, Waldemar und Portugal, Jose (2004): Sp1-Targeted Inhibition of Gene Transcription by WP631 in Transfected Lymphocytes., *Biochemistry* 43 [23], pp. 7584-7592. URL: <http://dx.doi.org/10.1021/bi036185e>
- [245] Wei, Daoyan; Wang, Liwei; He, Yanjuan; Xiong, Henry Q.; Abbruzzese, James L. und Xie, Keping (2004): Celecoxib Inhibits Vascular Endothelial Growth Factor Expression in and Reduces Angiogenesis and Metastasis of Human Pancreatic Cancer via Suppression of Sp1 Transcription Factor Activity, *Cancer Research* 64 [6], pp. 2030-2038. URL: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/abstract/64/6/2030>
- [246] Kim, Chun Sung; Choi, Hack Sun; Hwang, Cheol Kyu; Song, Kyu Young; Lee, Byung Kwon; Law, Ping Yee; Wei, Li Na und Loh, Horace H. (2006): Evidence of the neuron-restrictive silencer factor (NRSF) interaction with Sp3 and its synergic repression to the mu opioid receptor (MOR) gene, *Nucleic Acids Research* 34 [22], pp. 6392-6403. URL: <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/34/22/6392>
- [247] Wang, L.; Guan, X.; Zhang, J.; Jia, Z.; Wei, D.; Li, Q.; Yao, J. und Xie, K. (2008): Targeted inhibition of Sp1-mediated transcription for antiangiogenic therapy of metastatic human gastric cancer in orthotopic nude mouse models., *Int J Oncol* 33 [1], pp. 161-167.
- [248] Tischer, E.; Mitchell, R.; Hartman, T.; Silva, M.; Gospodarowicz, D.; Fiddes, J. C. und Abraham, J. A. (1991): The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing, *Journal of Biological Chemistry* 266 [18], pp. 11947-11954. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/266/18/11947>
- [249] Bureau, W.; Van Slyke, P.; Jones, J.; Han, R. N. N.; Ward, Nicole L.; Stewart, D. J. und Dumont, D. J. (2006): Chronic systemic delivery of angiopoietin-2 reveals a possible independent angiogenic effect, *AJP - Heart and Circulatory Physiology* 291 [2], pp. H948-H956. URL: <http://ajpheart.physiology.org/cgi/content/abstract/291/2/H948>
- [250] Chen, Zhang qun; Fisher, Robert J.; Riggs, Charles W.; Rhim, John S. und Lautenberger, James A. (1997): Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor-induced Endothelial Cell Migration by ETS1 Antisense Oligonucleotides, *Cancer Research* 57 [10], pp. 2013-2019. URL: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/abstract/57/10/2013>
- [251] Wernert, N.; Stanjek, A.; Kiriakidis, S.; Hugel, A.; Jha, H. C.; Mazitschek, R. und Giannis, A. (1999): Inhibition of Angiogenesis In Vivo by Ets-1 Antisense Oligonucleotides-Inhibition of Ets-1 Transcription Factor Expression by the Antibiotic Fumagillin, *Angew.Chem.Int Ed Engl.* 38 [21], pp. 3228-3231. URL: PM:10556911
- [252] Ingber, D.; Fujita, T.; Kishimoto, S.; Sudo, K.; Kanamaru, T.; Brem, H. und Folkman, J. (1990): Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth, *Nature* 348 [6301], pp. 555-557. URL: PM:1701033

## Anhang

### Zusätzliche Daten zur *Microarray*-Untersuchung

Tab. 19: Aufstellung von Genen aus der ANGIOGENESE-LISTE, die sowohl in EA.hy926 als auch HUVEC Zellen induziert wurden (FC>2).

GenBank	Genname	Gensymbol	EA.hy926	HUVEC
NM_133265	<i>Angiomotin</i>	<i>AMOT</i>	+	++
NM_003734	<i>Amine oxidase, copper containing 3</i>	<i>AOC3</i>	+	+
NM_000633	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>	<i>BCL2</i>	+	+
NM_004591	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 20</i>	<i>CCL20</i>	+	(+)
NM_144492	<i>Claudin 14</i>	<i>CLDN14</i>	++	+
NM_004370	<i>Collagen, type XII, <math>\alpha</math>1</i>	<i>COL12A1</i>	(+)	+
NM_000089	<i>Collagen, type I, <math>\alpha</math>2</i>	<i>COL1A2</i>	(+)	+
NM_004093	<i>Ephrin B2</i>	<i>EFNB2</i>	(+)	+++
NM_004443	<i>EPH receptor B3</i>	<i>EPHB3</i>	+	+
NM_007177	<i>Family with sequence similarity 107, member A</i>	<i>FAM107A</i>	+	+
NM_213647	<i>Fibroblast growth factor receptor 4</i>	<i>FGFR4</i>	+	+
NM_000612	<i>Insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)</i>	<i>IGF2</i>	+	+
NM_000599	<i>Insulin-like growth factor binding protein 5</i>	<i>IGFBP5</i>	+	+
NM_000640	<i>Interleukin 13 receptor, <math>\alpha</math>2</i>	<i>IL13RA2</i>	+++	+++
NM_002226	<i>Jagged 2</i>	<i>JAG2</i>	(+)	++
NM_002428	<i>Matrix metalloproteinase 15</i>	<i>MMP15</i>	+	+
NM_002429	<i>Matrix metalloproteinase 19</i>	<i>MMP19</i>	(+)	(+)
NM_004557	<i>Notch homolog 4 (Drosophila)</i>	<i>NOTCH4</i>	+	+++
NM_006475	<i>Periostin, Osteoblast specific factor</i>	<i>POSTN</i>	(+)	+
NM_005036	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor <math>\alpha</math></i>	<i>PPARA</i>	+	+
NM_001040058	<i>Secreted phosphoprotein 1</i>	<i>SPP1</i>	(+)	+
NM_003226	<i>Trefoil factor 3 (intestinal)</i>	<i>TFF3</i>	+	+
NM_003226	<i>Trefoil factor 3 (intestinal)</i>	<i>TFF3</i>	+	+
NM_000594	<i>Tumor necrosis factor</i>	<i>TNF</i>	+	+

**Tab. 20: Aufstellung von Genen aus der ANGIOGENESE-LISTE, die sowohl in EA.hy926 als auch in HUVEC Zellen runterreguliert wurden (FC<0,5).**

GenBank	Gennam	Gensymbol	EA.hy926	HUVEC
NM_002688	<i>Septin 5</i>	<i>SEPT5</i>	-	(-)
NM_003005	<i>Selektin P</i>	<i>SELP</i>	-	(-)
NM_004230	<i>Sphingosine-1-phosphate receptor 2</i>	<i>S1PR2</i>	-	-
NM_002840	<i>Protein tyrosin phosphatase, receptor type F</i>	<i>PTPRF</i>	--	--
NM_005856	<i>Receptor (G protein-coupled) activity modifying protein 3</i>	<i>RAMP3</i>	(-)	(-)
NM_004445	<i>EPH receptor B6</i>	<i>EPHB6</i>	-	-

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen mich bei all jenen zu bedanken, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben:

Herrn Prof. Dr. Alf Hamann danke ich für die Vertretung dieser Dissertation am Institut für Biologie der Humboldt-Universität zu Berlin.

Bei Herrn Prof. Dr. Michael Höcker bedanke ich mich für die Überlassung des Themas.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Thomas Jöns, der mich bereitwillig in seine Arbeitsgruppe aufgenommen und mir die Chance gegeben hat, meine Arbeit weiterzuführen.

Der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Wolfgang Kemmner am MDC in Berlin Buch danke ich für die Möglichkeit, die *Microarray*-Versuche in ihren Laboren durchführen zu können.

Bei der Sonnenfeld Stiftung bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung während der Anfangszeit meiner Promotion. Über die Zeit der Förderung hinaus war der Vorstandsvorsitzende Herr Prof. Dr.-Ing. Dr. med. h.c. Frhr. von Villiez am Fortgang meiner Dissertation interessiert und hat mich in persönlichen Gesprächen in meiner Arbeit bekräftigt.

Ohne die vielfältige Unterstützung von Freunden, die mich durch die Höhen und Tiefen in den letzten Jahren begleitet haben, wäre diese Arbeit sicherlich nicht zustande gekommen. Besonders möchte ich mich bei Nadine Rohwer und Petra Schulz bedanken, die bereitwillig die mühevollen Aufgabe des Korrekturlesens übernommen haben. Sie haben mich auf dem langen Weg der Promotion begleitet und mich nicht nur in wissenschaftlichen Fragen beraten, sondern waren auch neben dem Laboralltag für mich da. Weiteren hier nicht namentlich Genannten bin ich dankbar für ihre Hilfe und Ablenkung, den Ansporn, die Kritik und ihr Verständnis.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern und meiner Familie für ihre rückhaltlose Unterstützung während des Studiums und der Promotionszeit. Vor allem danke ich Babette und Robert, die es immer wieder geschafft haben mich durch lange Gespräche anzuspornen, meine Arbeit weiterzuführen.

## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und nur angegebene Hilfsmittel verwendet zu haben. Die aus anderen Quellen übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Ich habe mich noch keinem anderen Promotionsverfahren unterzogen und die Dissertation nicht in der gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Hochschule zur Promotion vorgelegt.

Die Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin habe ich zur Kenntnis genommen.

Berlin,

Wenke Jonas

---

## Veröffentlichungen

### Publikationen

Jonas W, Kemmner W, Jöns T

**Regulation of the Human Angiopoietin-2 Gene by Zinc Finger Proteins Sp1 and Sp3.**

(Manuskript in Vorbereitung)

### Vorträge

- 2006: 27. Deutscher Krebskongress, Postervortrag:

Wenke Jonas, <sup>1</sup>Johannes Hertel, <sup>2</sup>Mathias Strowski, <sup>1</sup>Michael Höcker

<sup>1</sup>Laboratory for Angiogenesis and Metastasis, <sup>2</sup>Department of Hepatology and Gastroenterology

Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Clinic, Berlin, Germany

**Interaction of Sp1 and Sp3 with an upstream GC-rich enhancer is essential for the transcriptional control of the human Angiopoietin-2 Gene (*ang-2*) in Endothelial Cells.**

- 2002: 18. Jahrestagung der Deutschen Adipositas Gesellschaft, Vortrag:

Wenke Jonas, Karen Schellong, Michael Boschmann

**Thermogenese, Lipogenese und Capsaicin.**

Abstract: Aktuel Ernährungsmed 27 (2002) S338.

Berlin,

Wenke Jonas